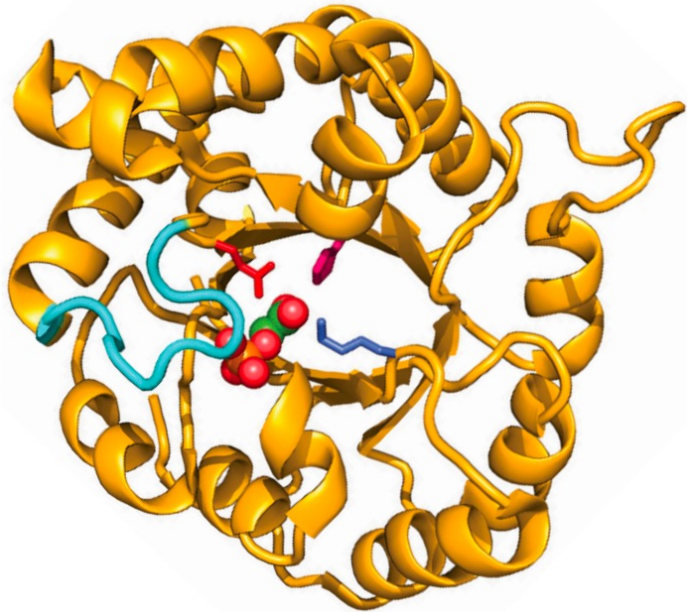


Enzimas

**CCM0111: Bioquímica, Estrutura de
Biomoléculas e Metabolismo**
Dr. Danilo B. Medinas



Triose-fosfato-isomerase em complexo com um
análogo do estado de transição

Material de estudo para prova

Voet: Capítulos 13, 14 e 15

Lehninger: Capítulo 6



<https://app.jove.com/science-education/v/12162/introduction-to-enzymes>

<https://app.jove.com/science-education/v/13906/enzymes-and-activation-energy>

<https://app.jove.com/science-education/v/11384/enzymes-lock-and-key-induced-fit-models-enzyme-inhibitors>

<https://app.jove.com/science-education/v/12164/concepts/introduction-to-enzyme-kinetics>

<https://app.jove.com/science-education/v/13131/concepts/turnover-number-and-catalytic-efficiency>

<https://app.jove.com/science-education/v/12165/catalytically-perfect-enzymes>

<https://app.jove.com/science-education/v/12166/concepts/introduction-to-mechanisms-of-enzyme-catalysis>

<https://app.jove.com/science-education/v/12167/concepts/ligand-binding-and-linkage>

<https://app.jove.com/science-education/v/12168/concepts/cooperative-allosteric-transitions>

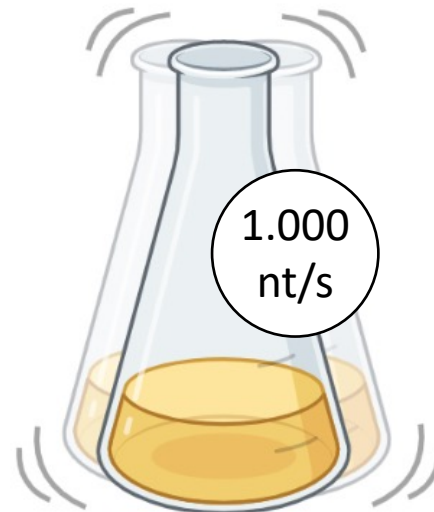
<https://app.jove.com/science-education/v/12169/concepts/ribozymes>

As reações químicas ocorrem de maneira rápida e controlada nos seres vivos.

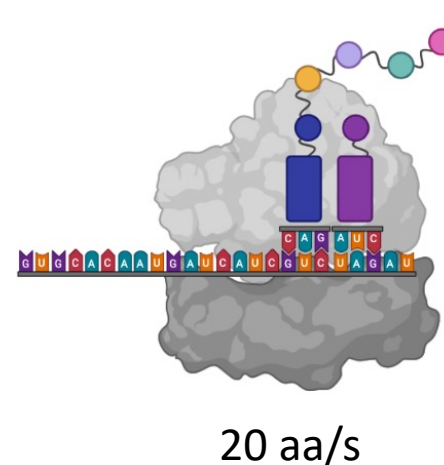
As **enzimas** surgiram na natureza para cumprir o papel de **catalisadores biológicos**.



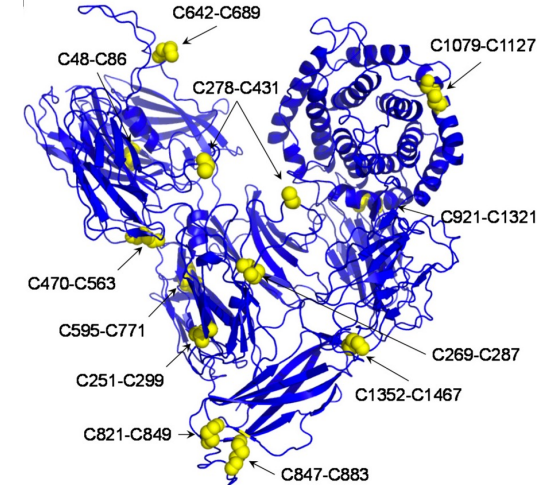
ATP



1.000
nt/s



20 aa/s



Classificação das enzimas

De acordo ao tipo de reação catalisada

TABLE 6–3 International Classification of Enzymes

<i>No.</i>	<i>Class</i>	<i>Type of reaction catalyzed</i>
1	Oxidoreductases	Transfer of electrons (hydride ions or H atoms)
2	Transferases	Group transfer reactions
3	Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)
4	Lyases	Addition of groups to double bonds, or formation of double bonds by removal of groups
5	Isomerases	Transfer of groups within molecules to yield isomeric forms
6	Ligases	Formation of C—C, C—S, C—O, and C—N bonds by condensation reactions coupled to ATP cleavage

Note: Most enzymes catalyze the transfer of electrons, atoms, or functional groups. They are therefore classified, given code numbers, and assigned names according to the type of transfer reaction, the group donor, and the group acceptor.

Natureza química das enzimas

Proteína ou RNA (Ribozimas)

Podem utilizar cofatores e coenzimas

TABLE 6-2 Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (:H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

Note: The structures and modes of action of these coenzymes are described in Part II.

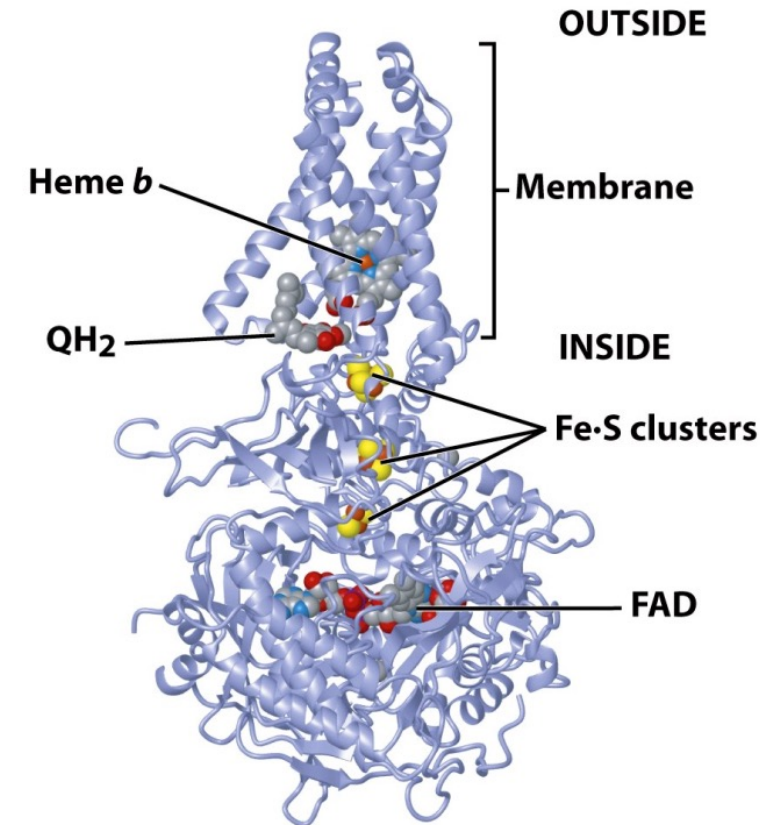
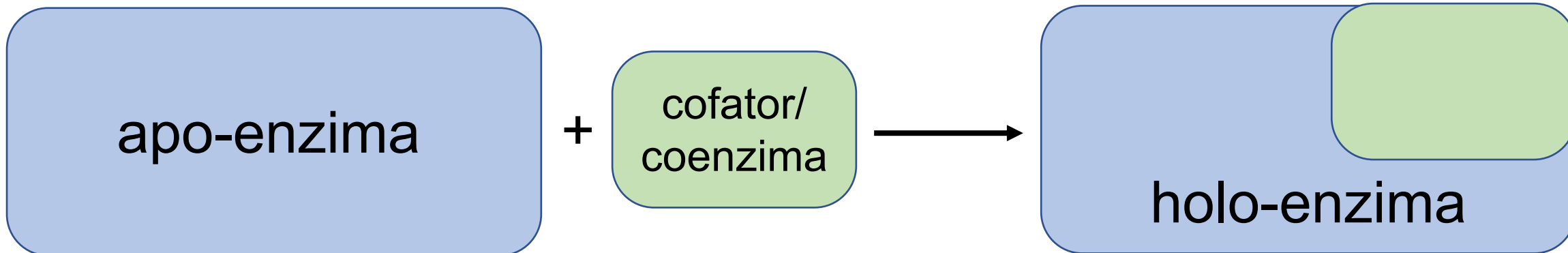


Figure 14-8 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Succinato desidrogenase



Determinantes físico-químicos das reações

Termodinâmica: as reações químicas devem ser energeticamente favoráveis, ou seja, possuírem uma variação de energia livre negativa. $\Delta G < 0$.

⚠ Uma reação química termodinamicamente favorável não significa que ela acontece com uma velocidade compatível com a vida.

Determinantes físico-químicos das reações

O caminho químico entre reagentes e produtos passa por um estado de transição, \ddagger . A energia necessária para produzir o estado de transição, ΔG^\ddagger , gera uma barreira termodinâmica para a reação que determina sua velocidade.

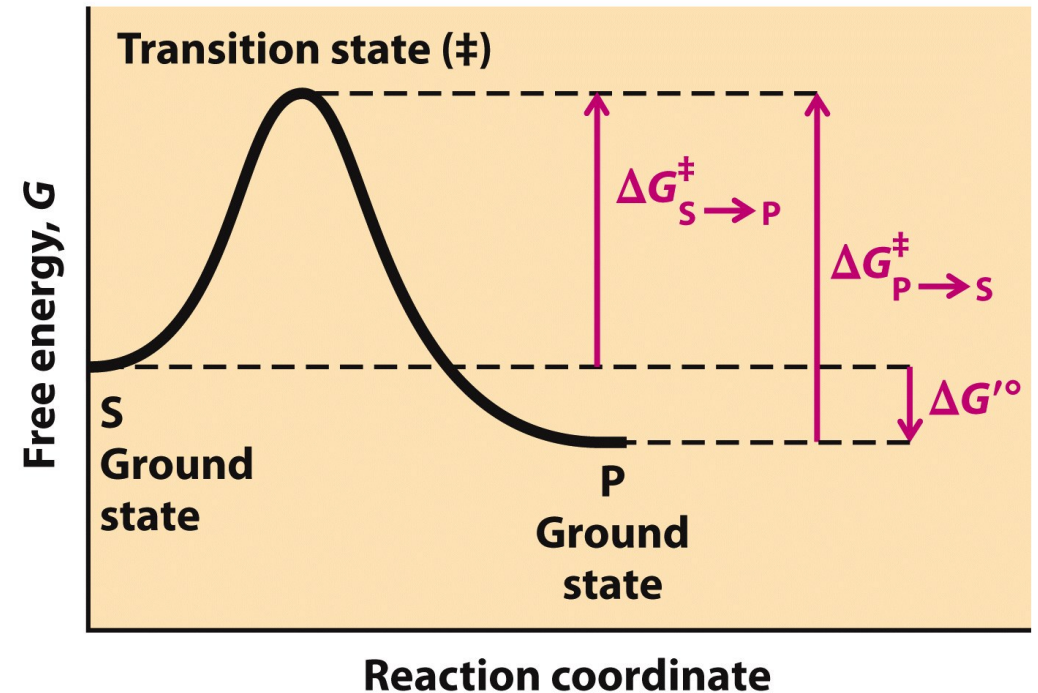


Figure 6-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

As reações químicas entram em equilíbrio



$$K_{\text{eq}} = \frac{[C]_{\text{eq}}^c [D]_{\text{eq}}^d}{[A]_{\text{eq}}^a [B]_{\text{eq}}^b}$$

O equilíbrio químico é determinado pela termodinâmica do estado inicial e final.

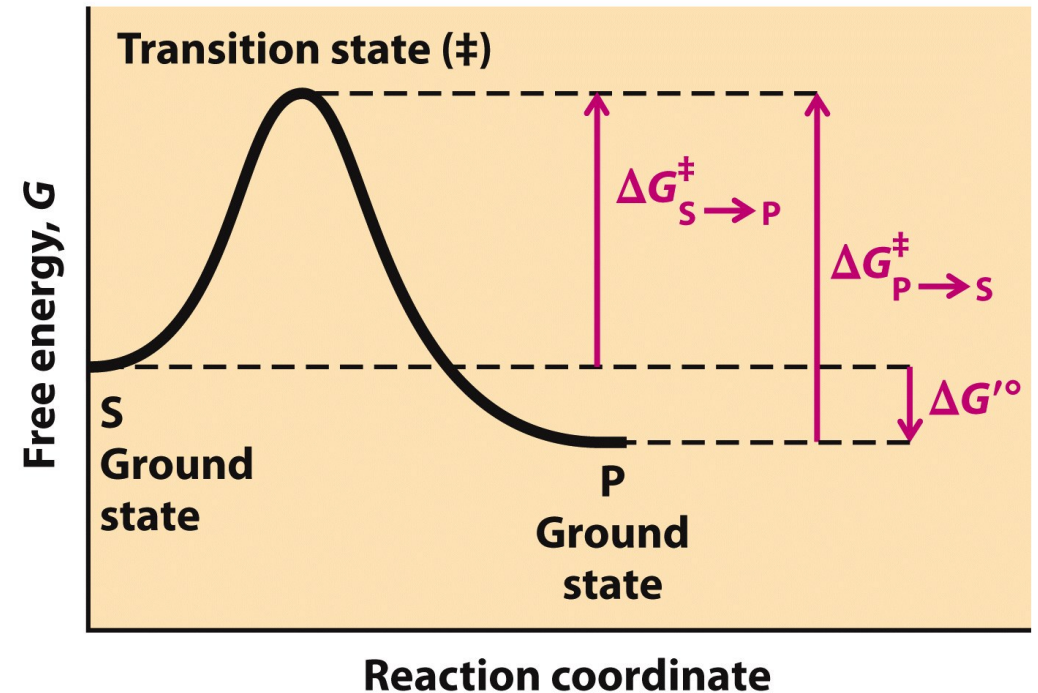


Figure 6-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

As enzimas são capazes de acelerar as reações

As enzimas **diminuem** a barreira termodinâmica, ou seja, a **energia de ativação**, do complexo de transição.

⚠ As enzimas não alteram o equilíbrio das reações!!!

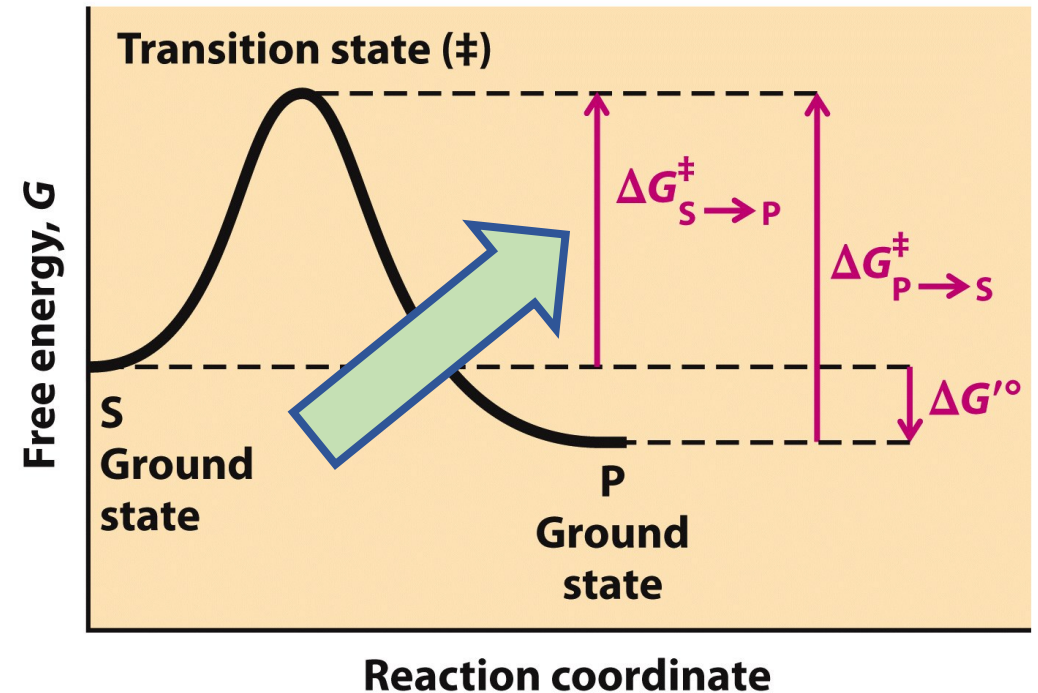


Figure 6-2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Relevo energético da reação catalisada

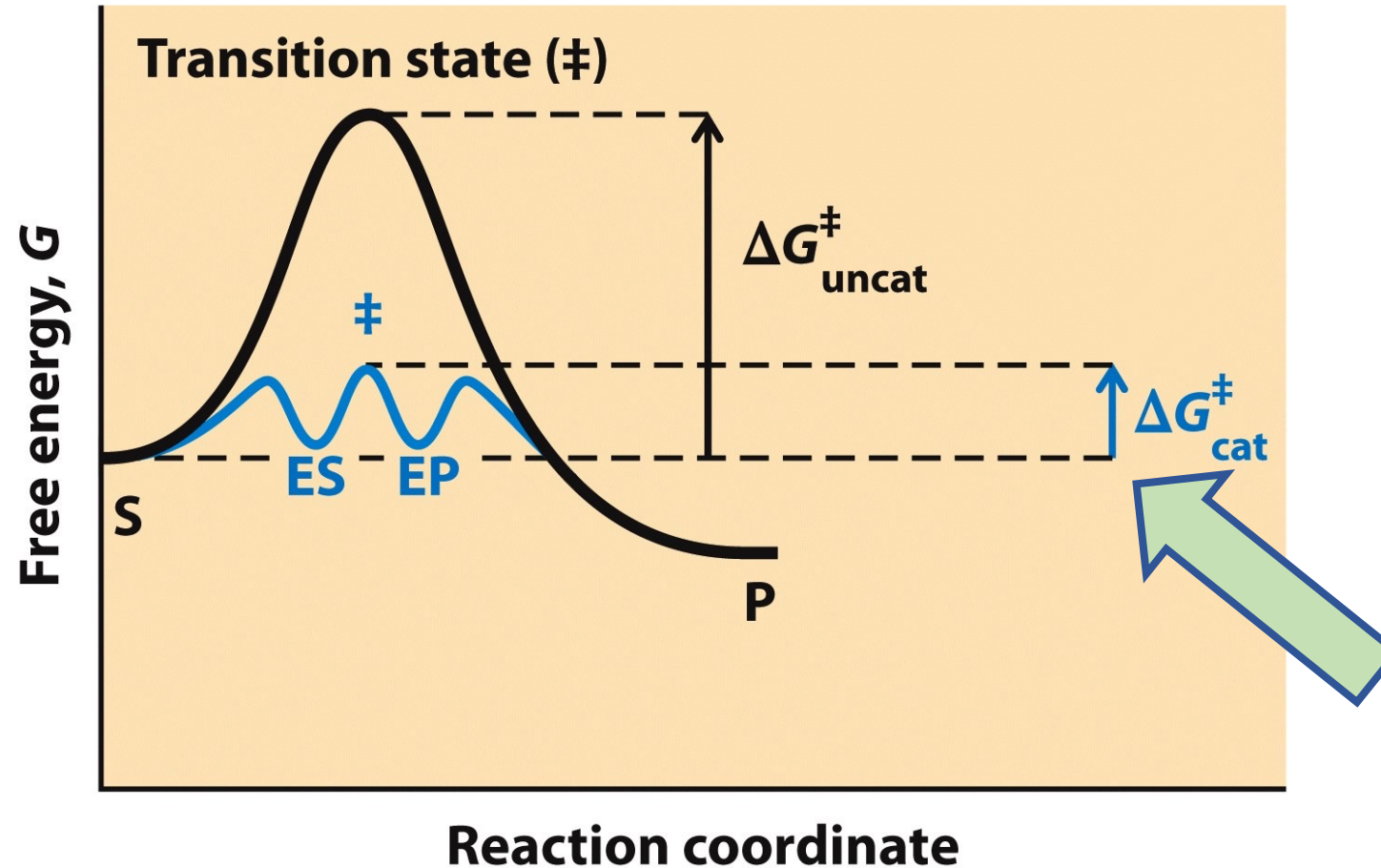


Figure 6-3
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

O impacto de enzimas em reações

TABLE 6-5 Some Rate Enhancements Produced by Enzymes

Cyclophilin	10^5
Carbonic anhydrase	10^7
Triose phosphate isomerase	10^9
Carboxypeptidase A	10^{11}
Phosphoglucomutase	10^{12}
Succinyl-CoA transferase	10^{13}
Urease	10^{14}
Orotidine monophosphate decarboxylase	10^{17}

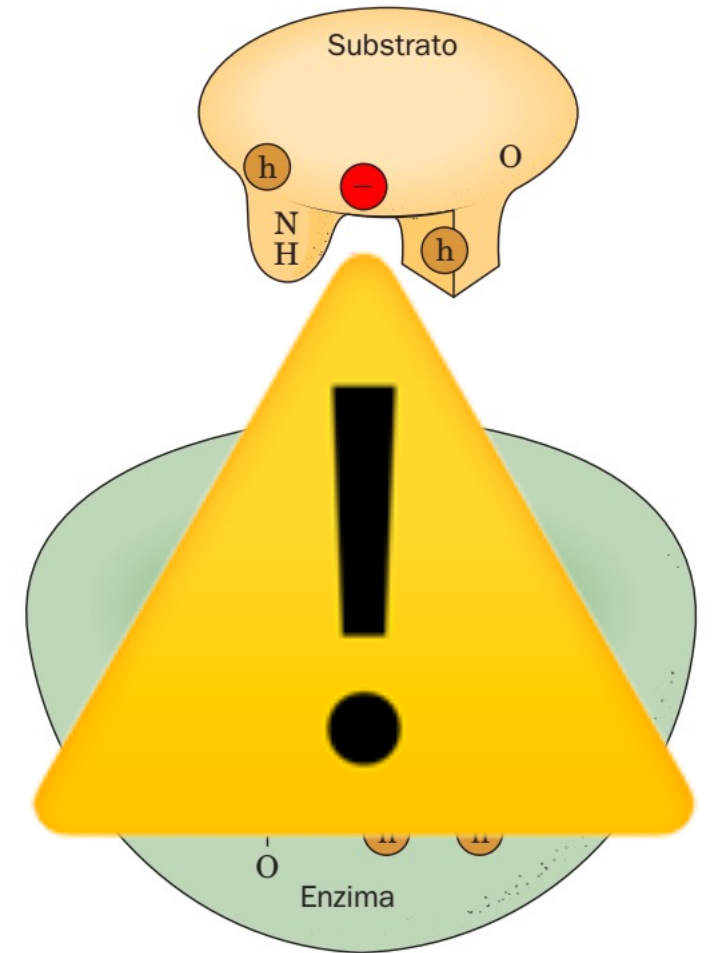
Como funcionam as enzimas?

Como a especificidade pelo substrato é determinada?

Como a barreira energética do estado de transição é reduzida?

As enzimas possuem um sitio ativo

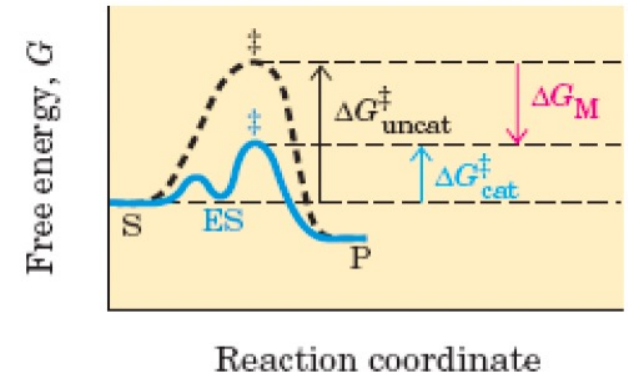
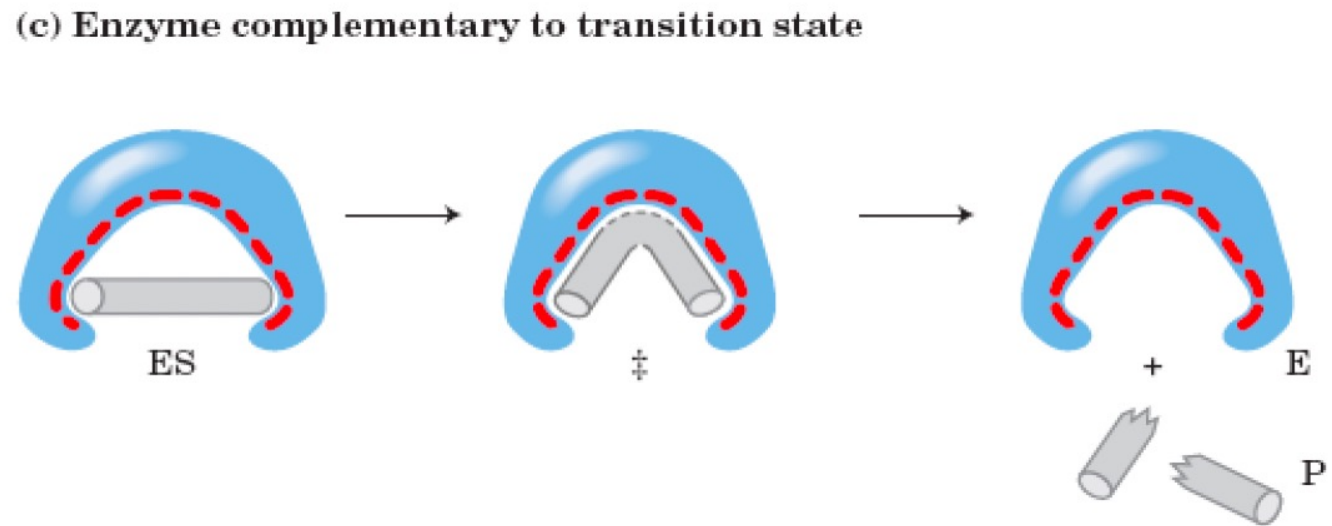
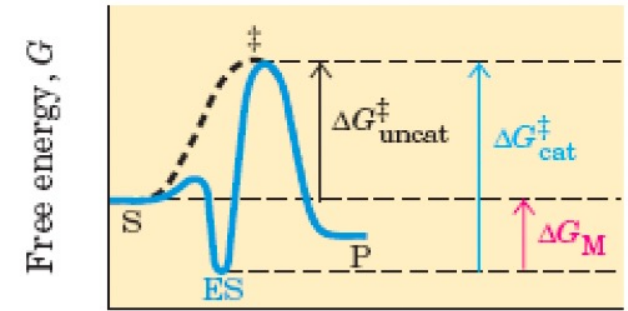
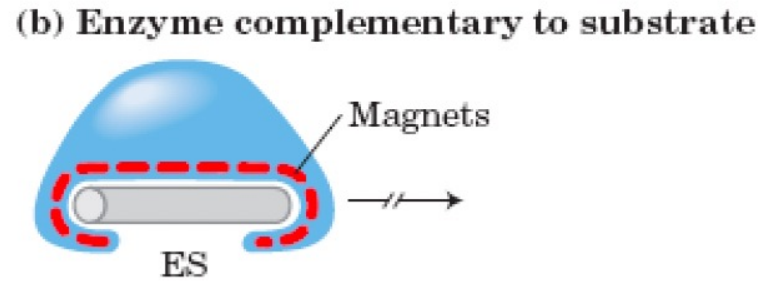
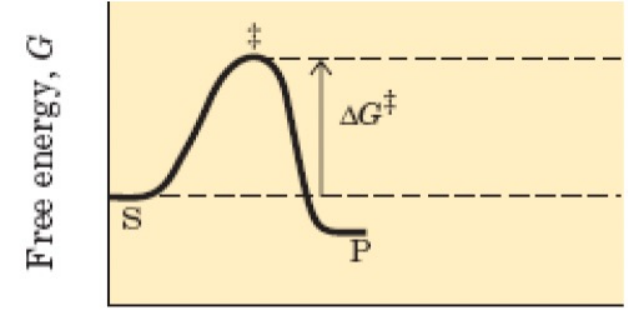
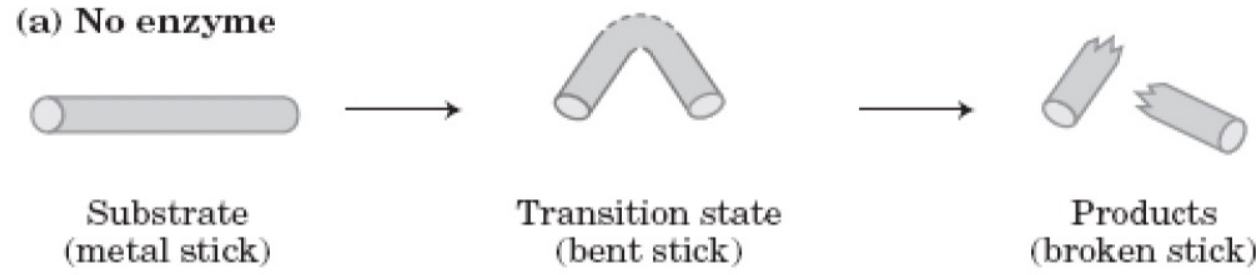
A reação ocorre em uma cavidade da enzima, o sitio ativo, capaz de **facilitar o encontro de substratos** com uma geometria favorável para a quebra e formação de ligações químicas para gerar produtos de maneira estéreo-específica, ademais de promover interações entre enzima e substrato envolvendo **várias ligações fracas** que contribuem para a especificidade, por ser parcialmente complementar ao substrato, e para a catálise, por enfraquecer ligações que serão rompidas, **estabilizando o estado de transição**.



Chave-Fechadura

Encaixe induzido

As enzimas devem ser complementares não ao substrato, mas ao estado de transição da reação.

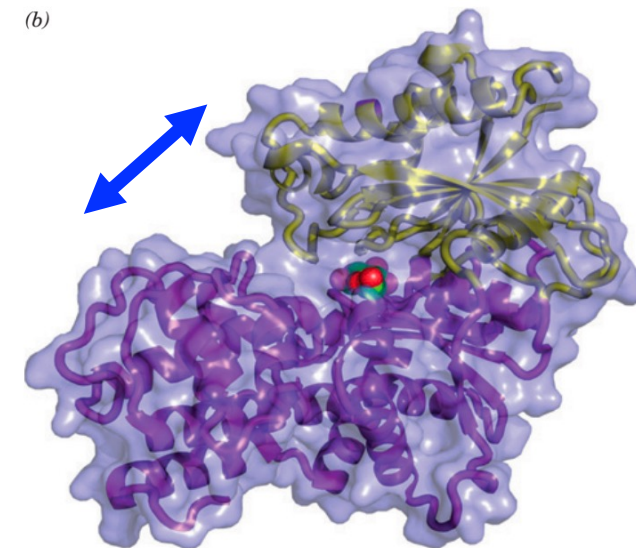
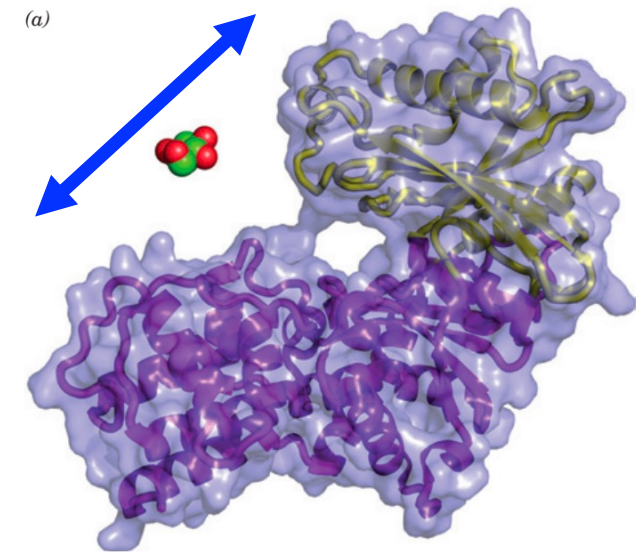


A ação das enzimas se baseia em:

Complementariedade parcial com o substrato, acomodando o estado de transição por um encaixe induzido (*'induced fit'*).

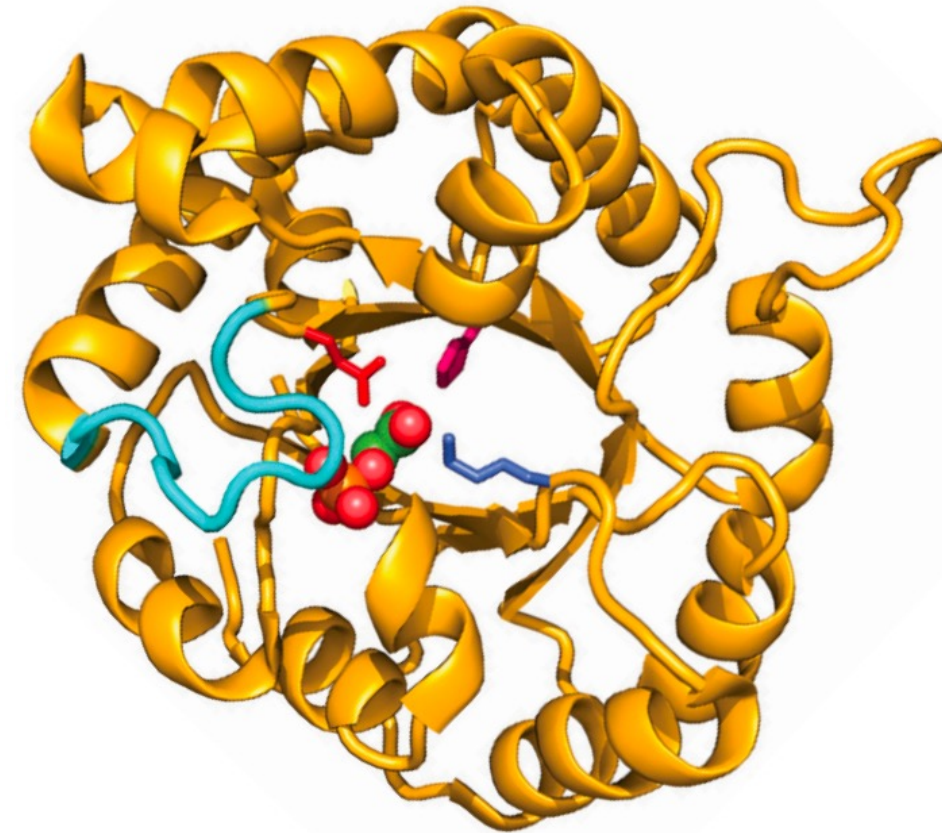
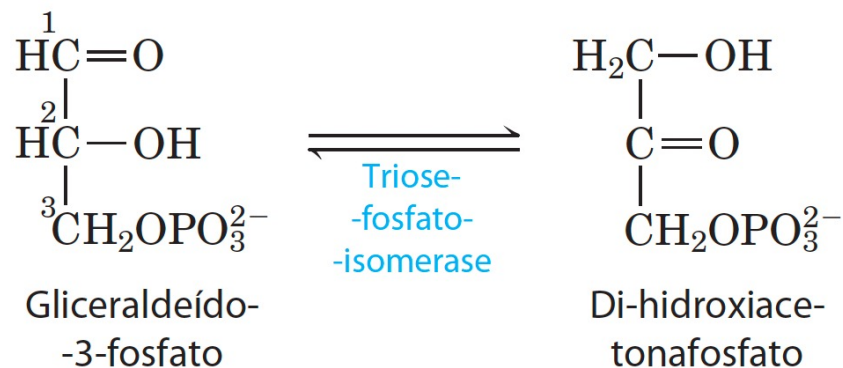
Um ajuste geométrico que alinha os grupos reativos e promove interações fracas para estabilizar o estado de transição.

Mudança conformacional da hexocinase

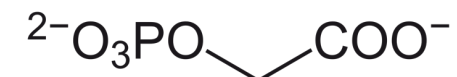


Estabilização pela energia de ligação. Exemplo da triose fosfato isomerase

- Catalisa a interconversão entre gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato.
- Grupo fosfato contribui para estabilizar o estado de transição, apesar de não estar diretamente envolvido na transformação química catalisada.
- A evidência é que a reação com gliceraldeído como substrato é muito mais lenta.

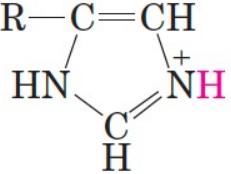
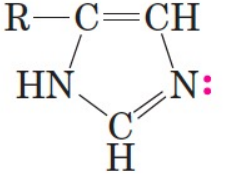
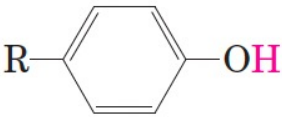
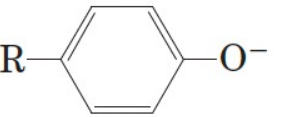


Triose-fosfato-isomerase em complexo com um análogo do estado de transição, **2-fosfoglicolato**.

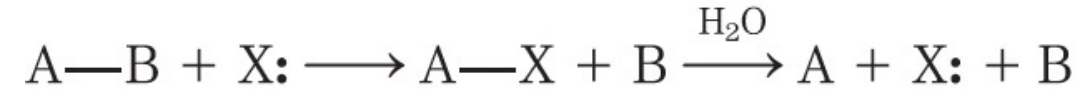
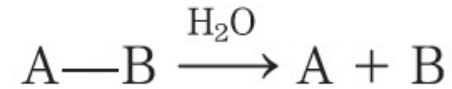


Tipos de catálise

Catálise ácido-base.

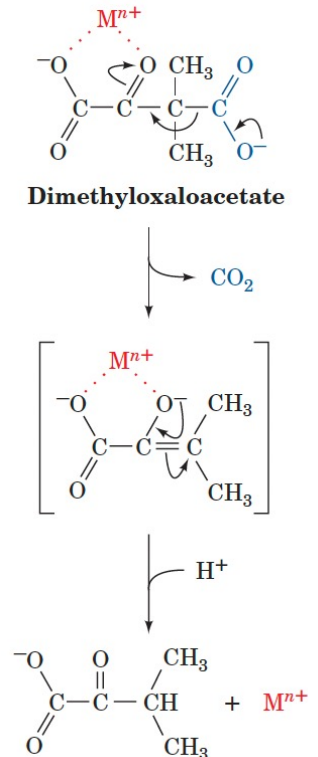
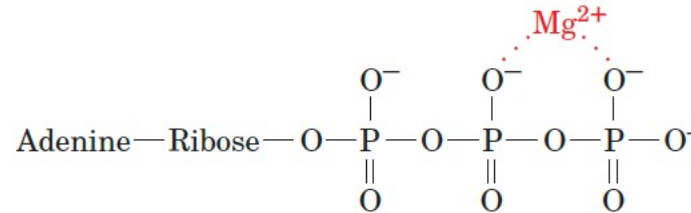
Resíduo de aminoácido	Forma geral ácida (doador de próton)	Forma geral básica (aceptor de próton)
Glu, Asp	R-COOH	R-COO ⁻
Lys, Arg	R-N ⁺ H ₃	R-NH ₂
Cys	R-SH	R-S ⁻
His		
Ser	R-OH	R-O ⁻
Tyr		

Catálise covalente.



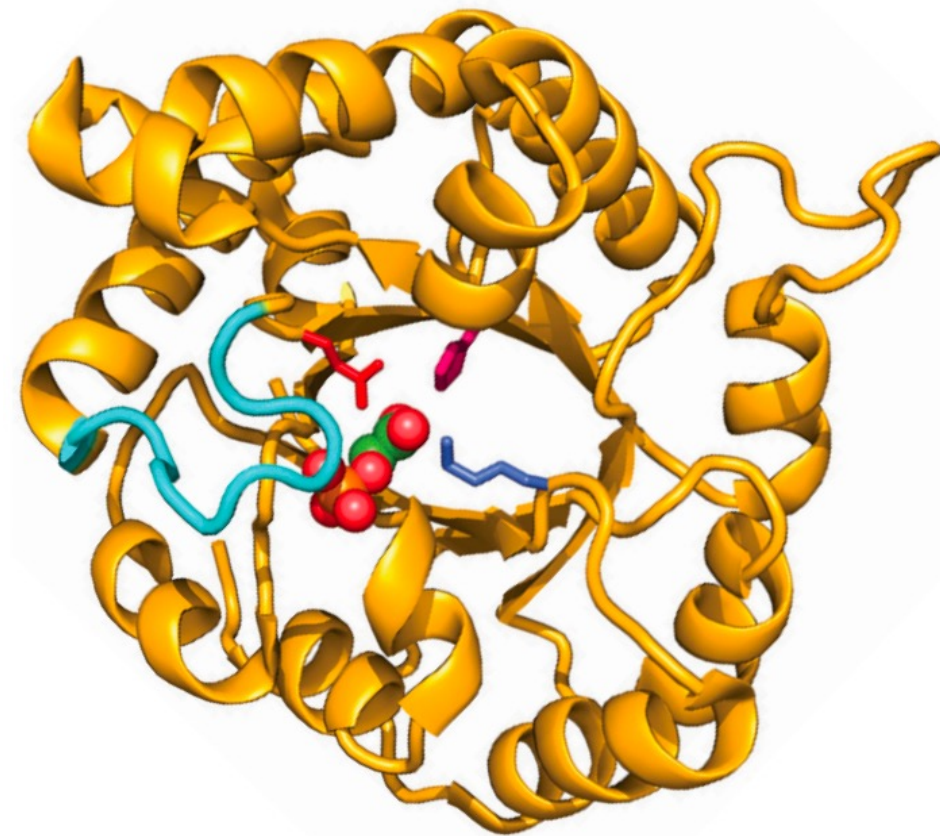
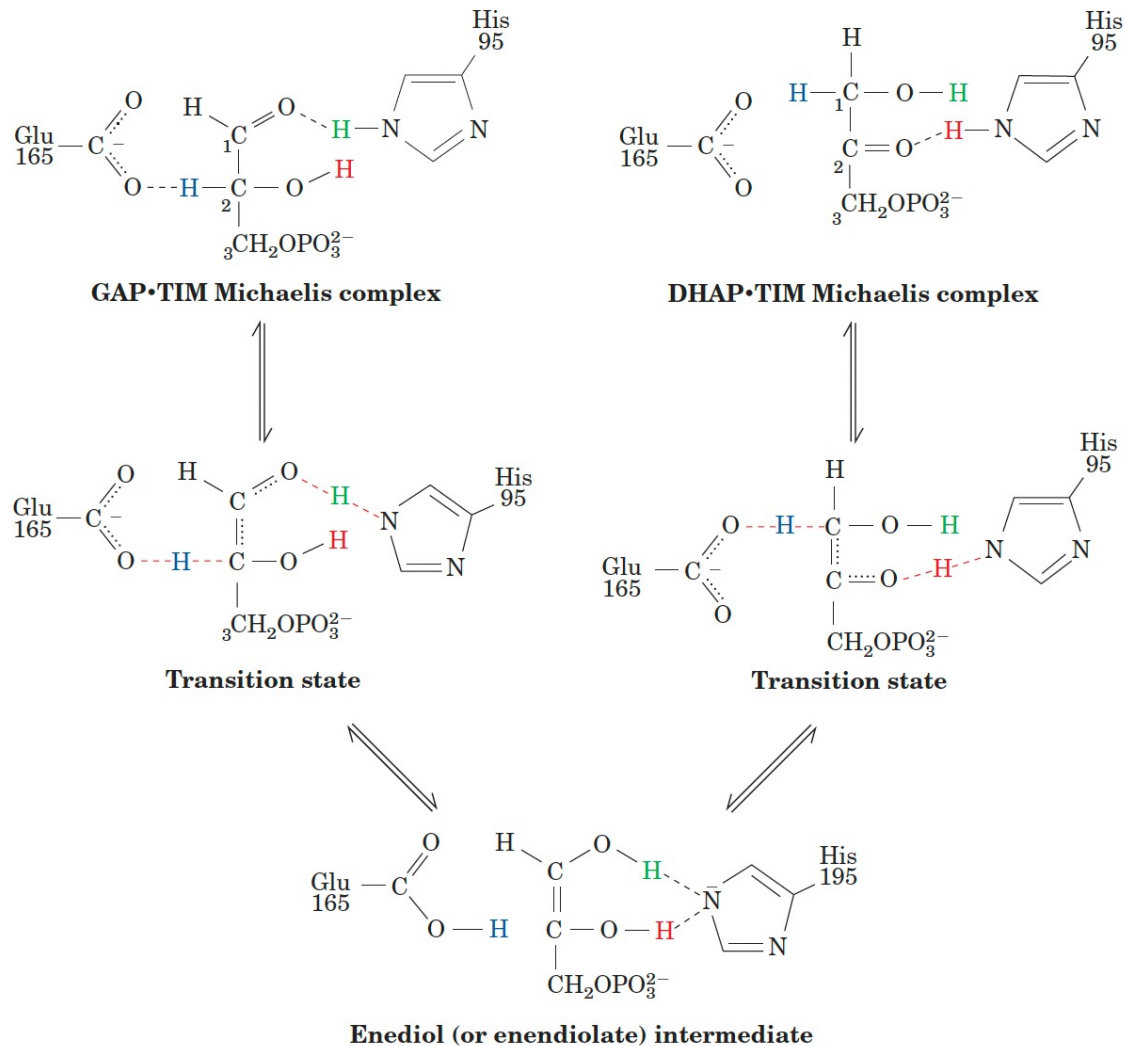
Catálise por íons metálicos.

- Blindagem e estabilização de carga.
- Ionização da água.
- Redox.

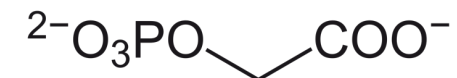


A triose fosfato isomerase faz catálise ácido-base

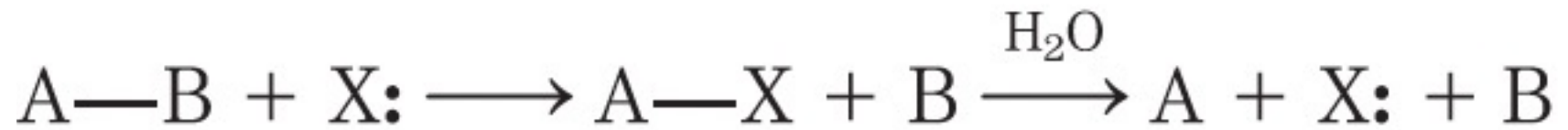
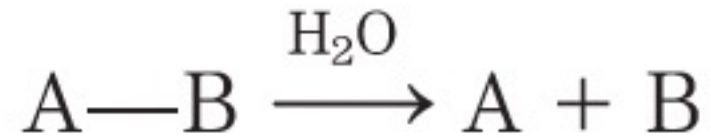
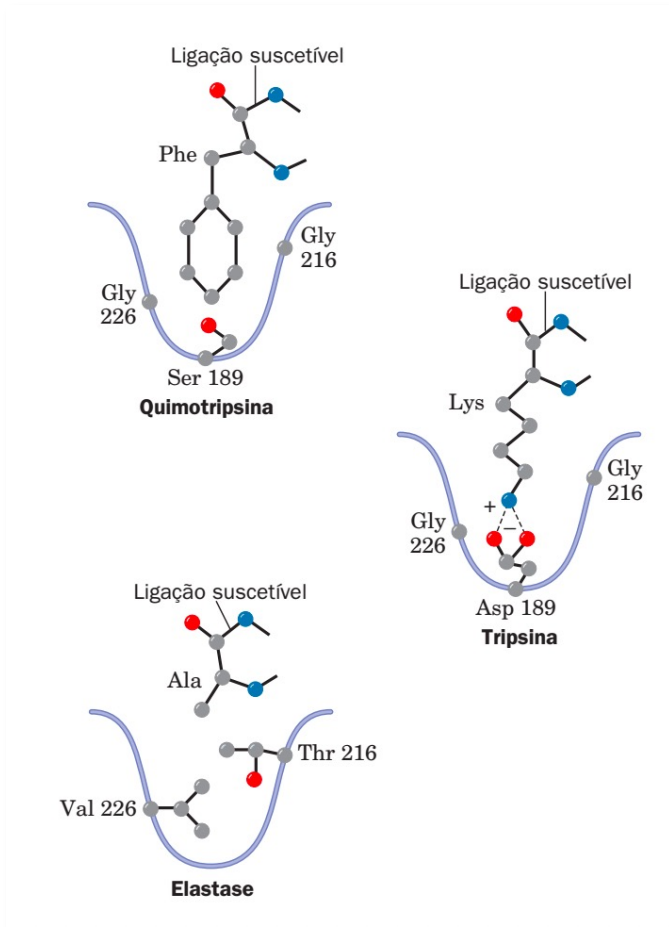
- Catálise ácido-base.



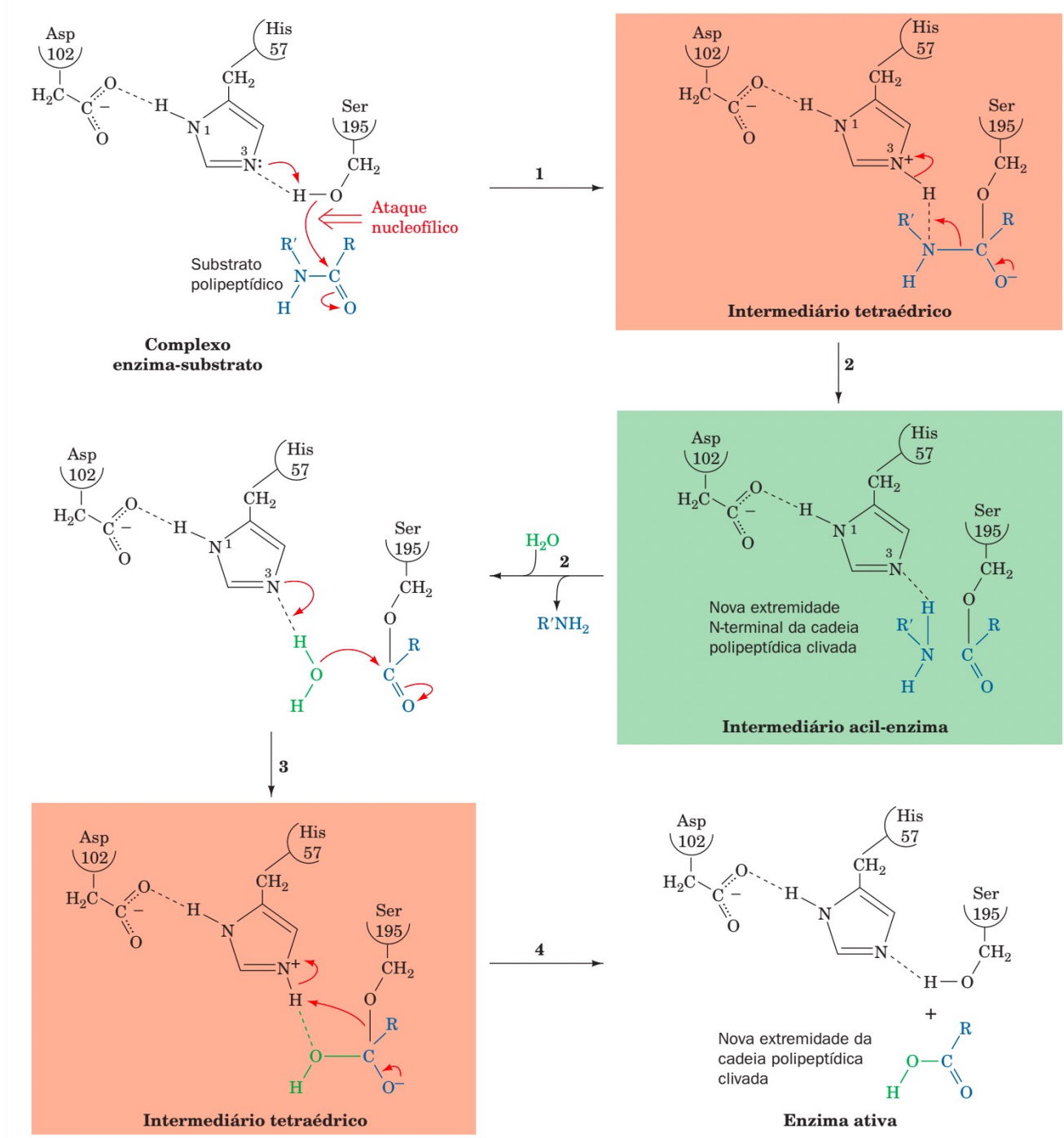
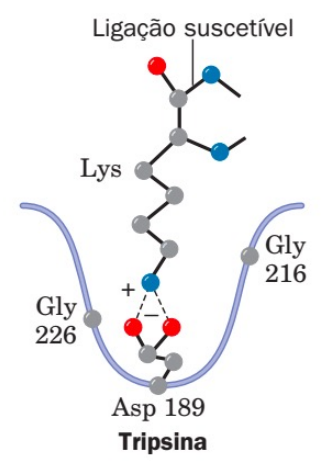
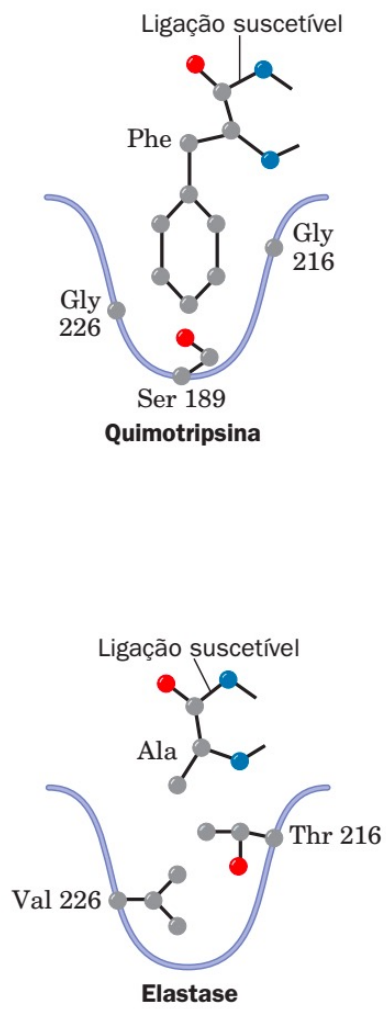
Triose-fosfato-isomerase em complexo com um análogo do estado de transição, **2-fosfoglicolato**.



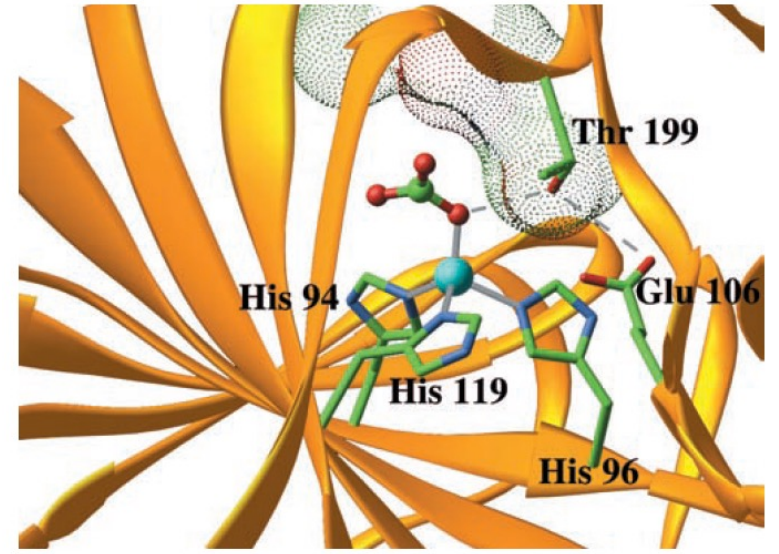
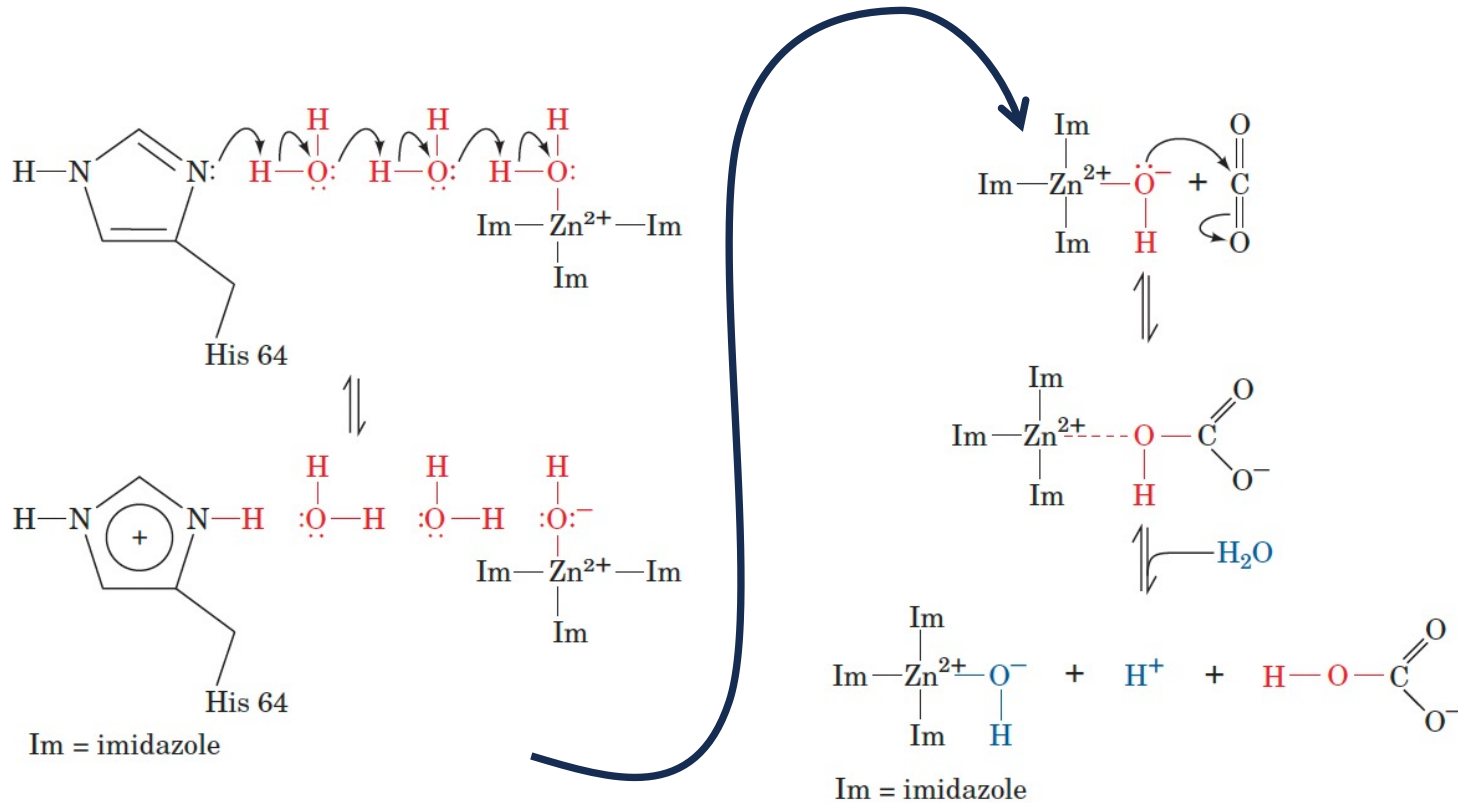
Especificidade e Eficiência. **Triáde catalítica em serina proteases faz catálise covalente e ácido-base.**



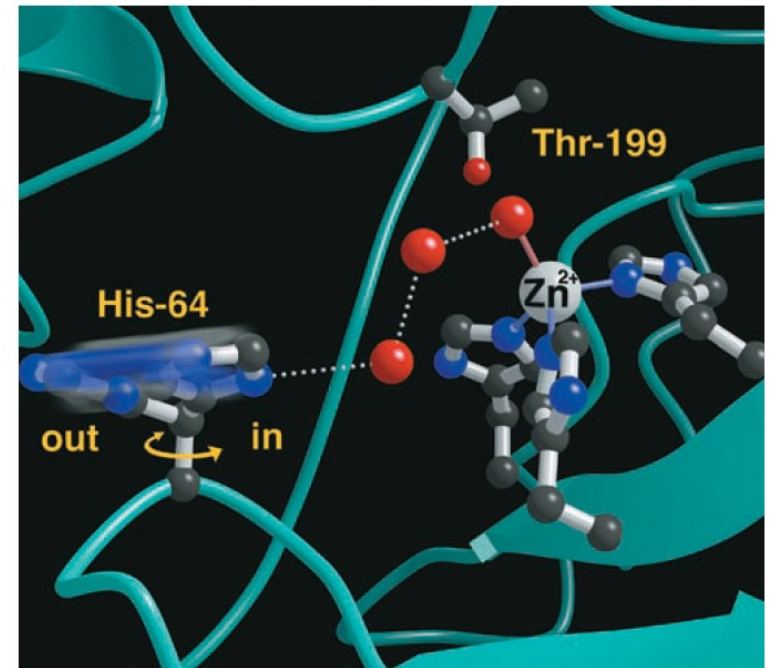
Especificidade e Eficiência. As enzimas são recicladas.



Anidrase carbônica. Catálise metálica com lançadeira de prótons.



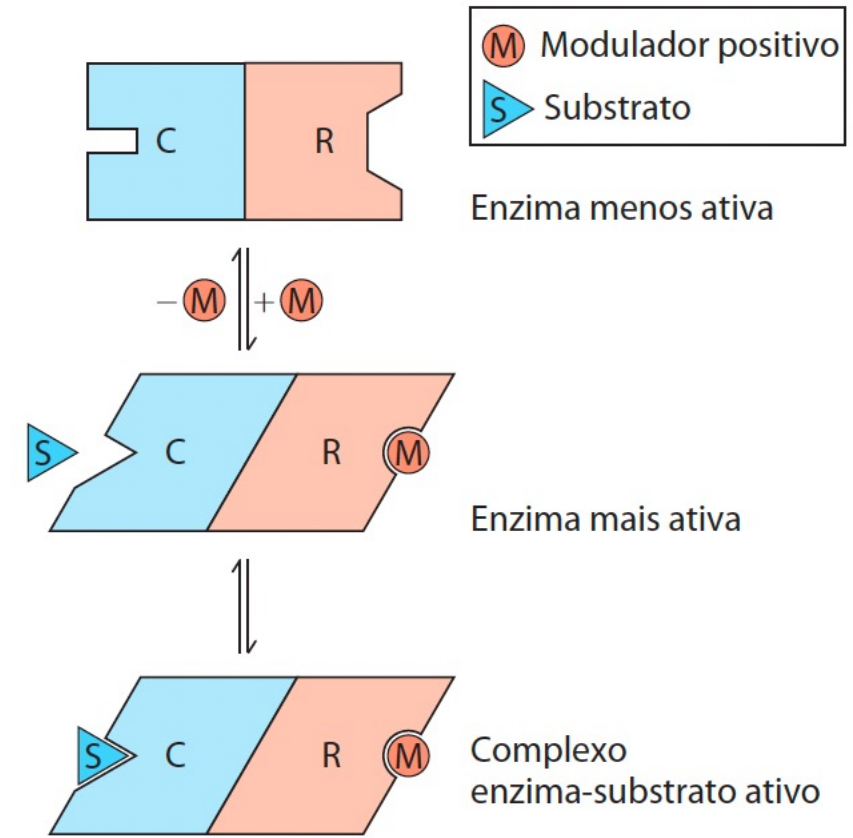
(a)



(b)

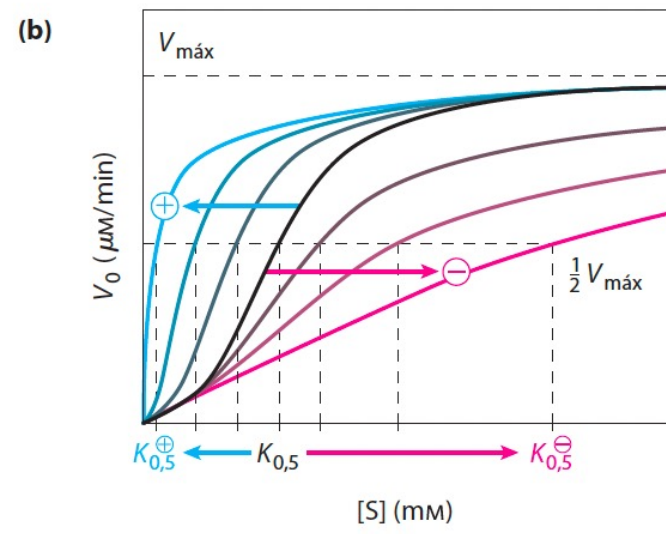
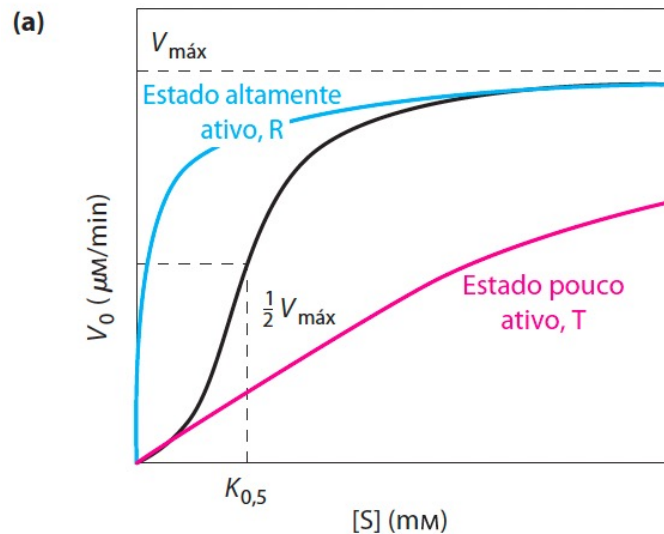
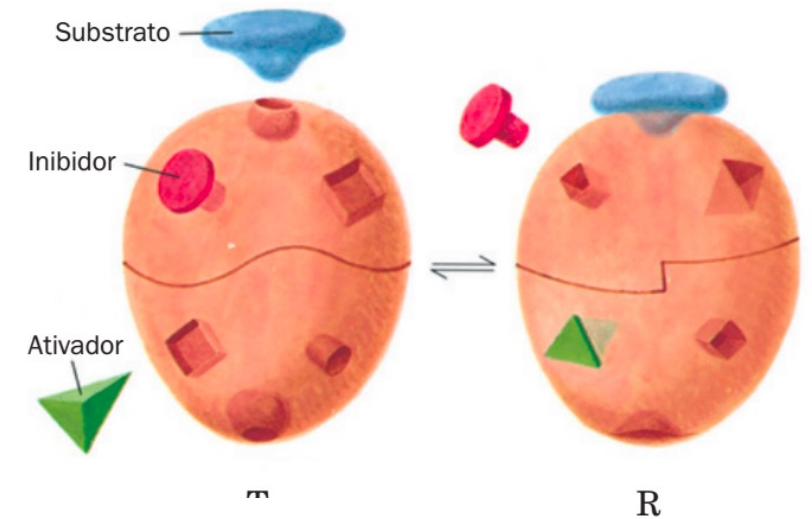
Enzimas regulatórias

As enzimas funcionam encadeadas em vias metabólicas altamente interconectadas. Algumas enzimas exercem papel regulador do fluxo metabólico por catalisarem reações que não estão em equilíbrio. Este papel regulador ocorre pela modulação da atividade catalítica da enzima em questão, seja pela **ligação de moduladores alostéricos**, seja pela **modificação covalente reversível** associada a cascatas de sinalização celular. As enzimas também podem ser ativadas por interações com outras proteínas e proteólise (neste caso, de maneira irreversível).



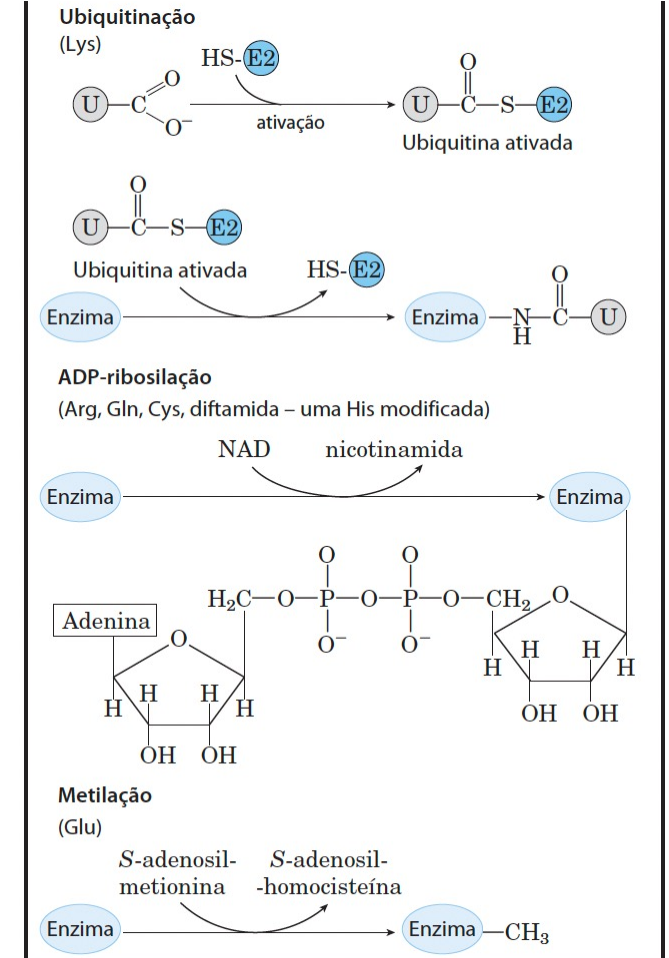
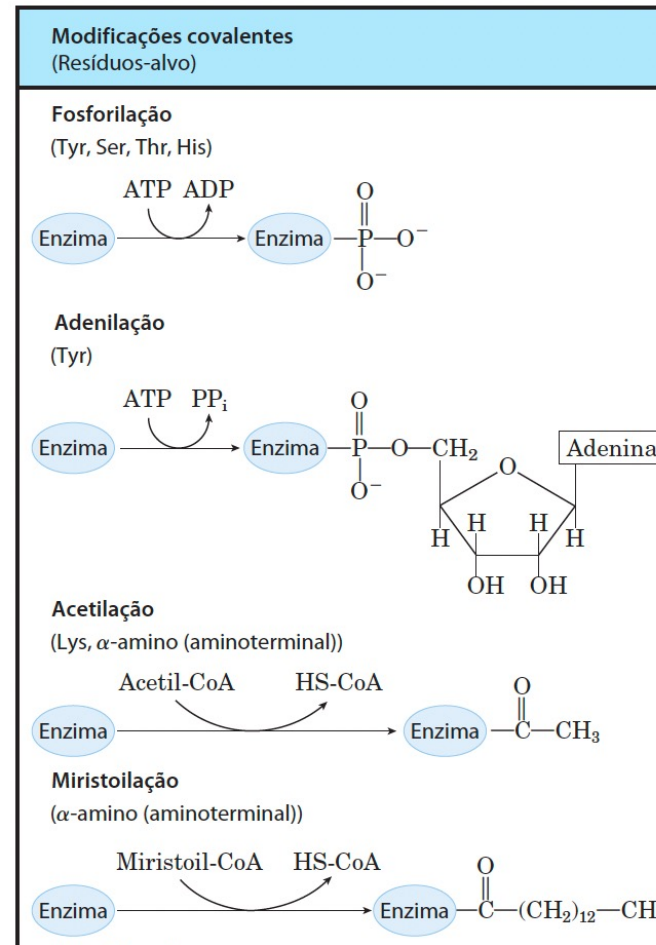
Regulação da atividade enzimática

Mecanismo alostérico: ligações reversíveis e não covalentes de moléculas moduladoras que geralmente são metabolitos relacionados direta ou indiretamente a via em que participa a enzima. Geram mudanças conformacionais, que podem interconverter a enzima entre um estado ativo e outro inativo.



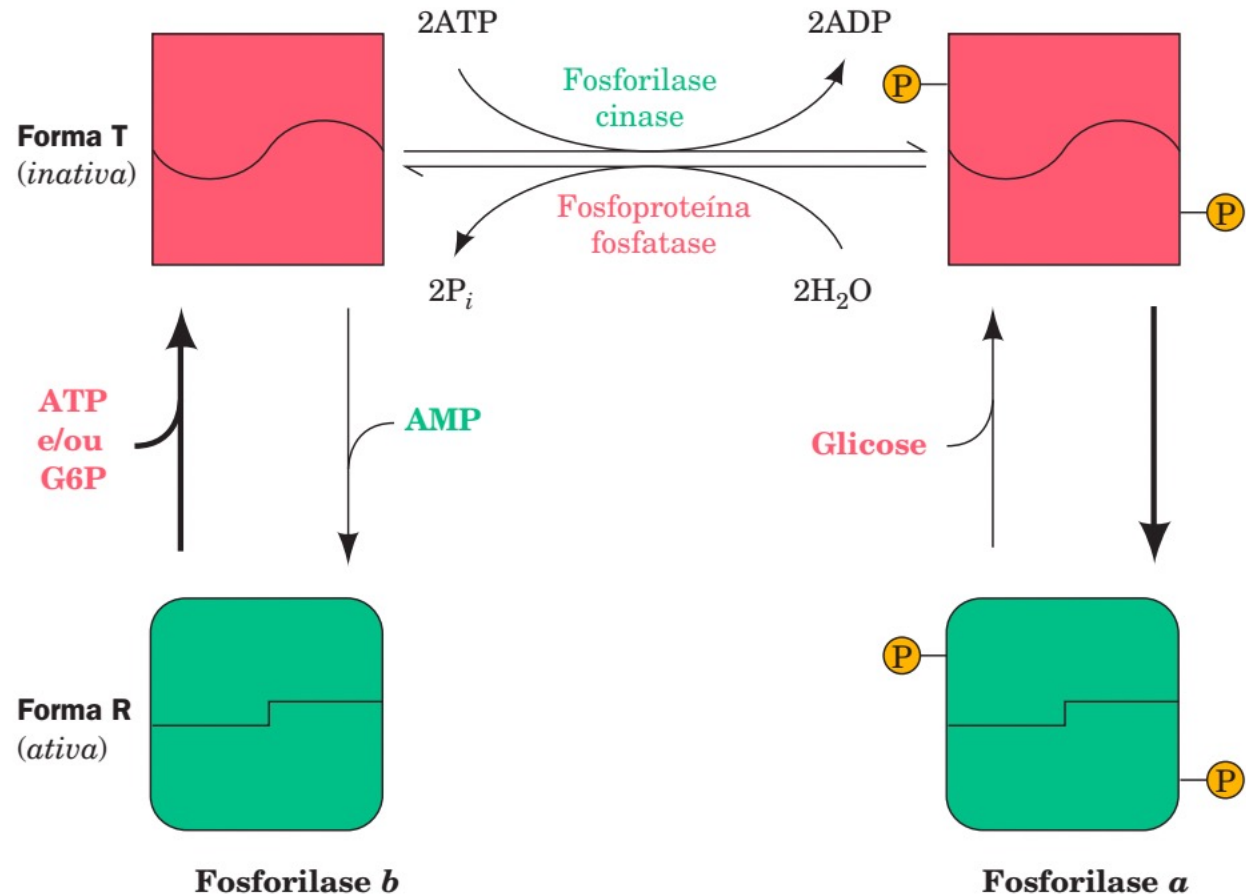
Regulação da atividade enzimática

Modificação pós-traducional: através da conjugação de grupos químicos aos seus resíduos de aminoácidos, uma enzima pode ser ativada ou inativada.



Metabolismo do glicogênio

A glicogênio fosforilase catalisa a etapa que regula a degradação de glicogênio e esta sujeita tanto a controle alostérico quanto a modificação covalente por fosforilação.



Exercícios

1. Explique como enzimas aceleram a velocidade de reações.
2. O milho é doce ao ser colhido. Se for estocado por alguns dias, perde o gosto doce pois os seus açúcares são convertidos em amido. Ferver o milho na hora da colheita retém o saber doce por mais tempo. Explique porque.
3. Explique porque o modelo de chave-fechadura não é adequado para explicar o mecanismo de funcionamento de enzimas. Descreva a que estado o sítio ativo da enzima é complementar.
4. A fosfofrutoquinase é uma enzima que utiliza ATP como substrato, sendo também inibida por ATP em altas concentrações. Explique esse fenômeno.
5. Descreva os principais tipos de catálise enzimática.

**Como descrevemos
matematicamente a catálise
enzimática? O estudo da cinética
fornece elementos para conhecer o
mecanismo da reação.**

Atenção

A velocidade de reações catalisadas dependem de:

- **Natureza e concentração da enzima**
- **Concentração dos substratos**
- **Temperatura**
- **pH**
- **Cofatores, coenzimas e outros**

O início da cinética enzimática



Adrian Brown, 1902

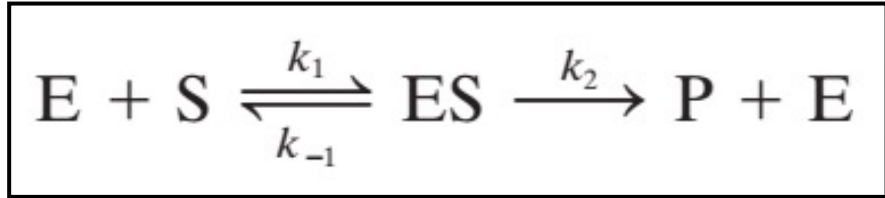
Estudos da conversão da sacarose a glicose e frutose catalisada pela invertase.

- A altas concentrações de substrato, a reação atingiu uma velocidade máxima ($V_{máx}$). Assim, a reação passa a ser independente da concentração do substrato, ou seja, possui **ordem zero**.

Hipótese: A enzima forma um complexo com o substrato, ES, que então decai a produtos e regenera a enzima.



Expressão da velocidade de reação



$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{ES}]$$

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{S}] - k_{-1}[\text{ES}] - k_2[\text{ES}]$$

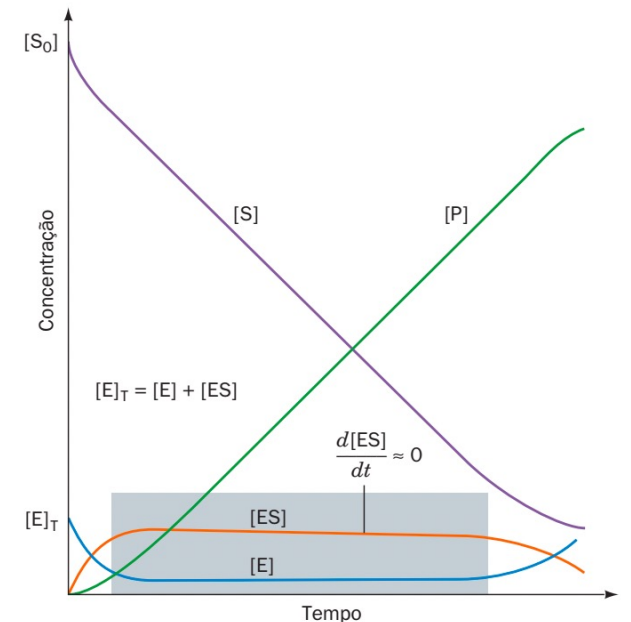
Simplificações:

Equilíbrio:

$$k_{-1} \gg k_2 \quad \therefore \quad K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}$$

Estado estacionário:

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = 0$$



Expressão da velocidade de reação

Formas da enzima:

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] ; \quad \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$[ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S]) = k_1[E]_T[S]$$

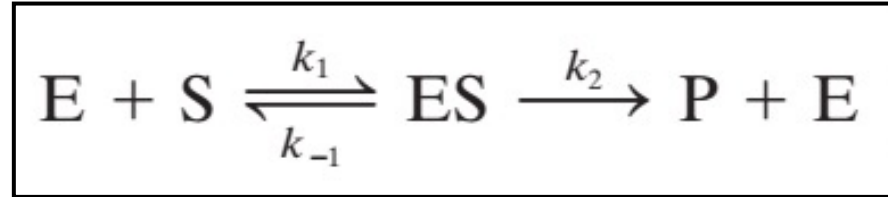
$$\frac{[ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S])}{k_1} = \frac{k_1[E]_T[S]}{k_1}$$

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]}$$


$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Constante de Michaelis

Expressão da velocidade de reação




$$v_o = \left(\frac{d[\text{P}]}{dt} \right)_{t=t_s} = k_2[\text{ES}] = \frac{k_2[\text{E}]_T[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$$


$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}]_T[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$$

Enzima saturada na velocidade máxima

$$V_{\text{máx}} = k_2[\text{E}]_T$$

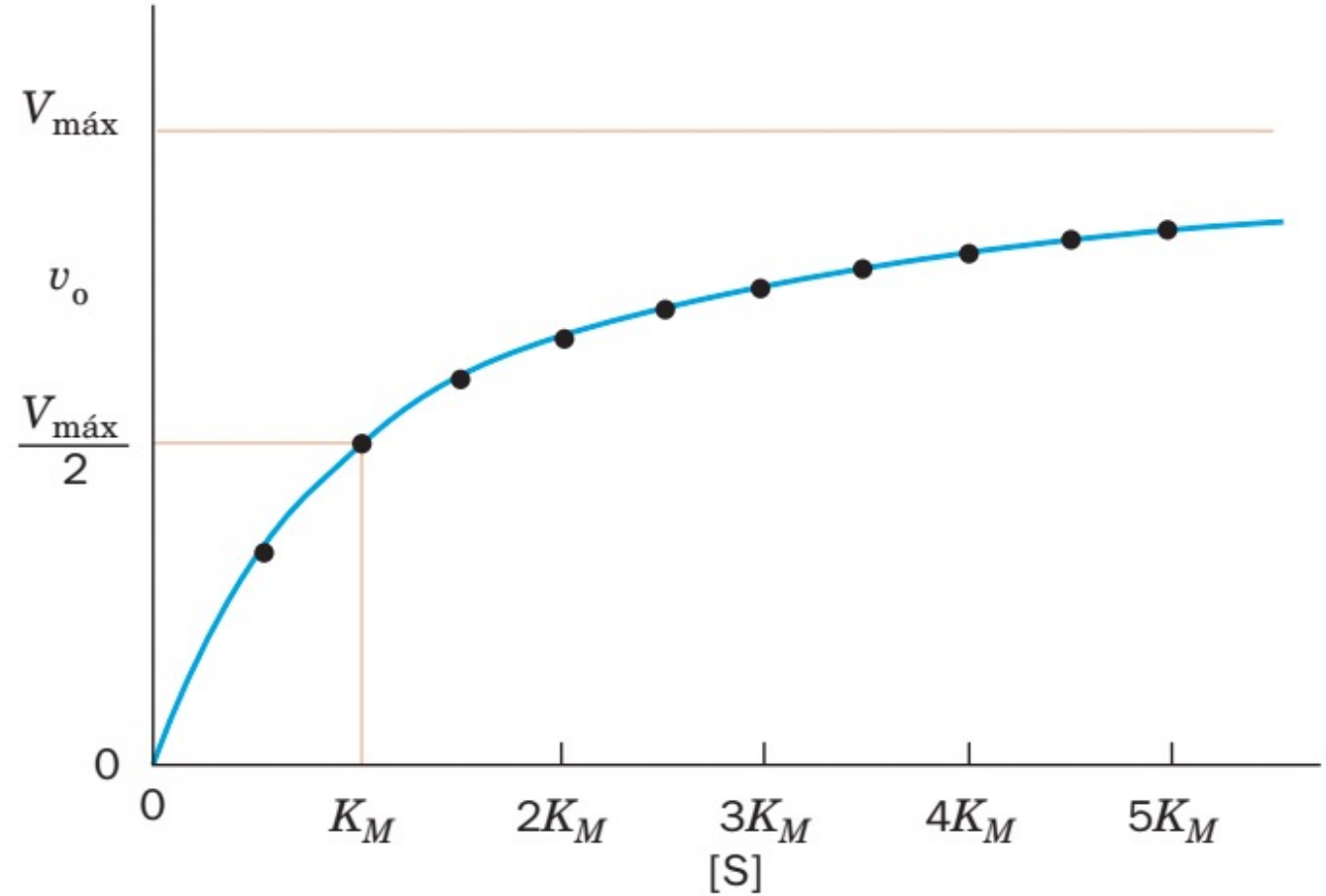

$$v_o = \frac{V_{\text{máx}}[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$$

Equação de Michaelis-Menten

Variação da velocidade em função da [S]

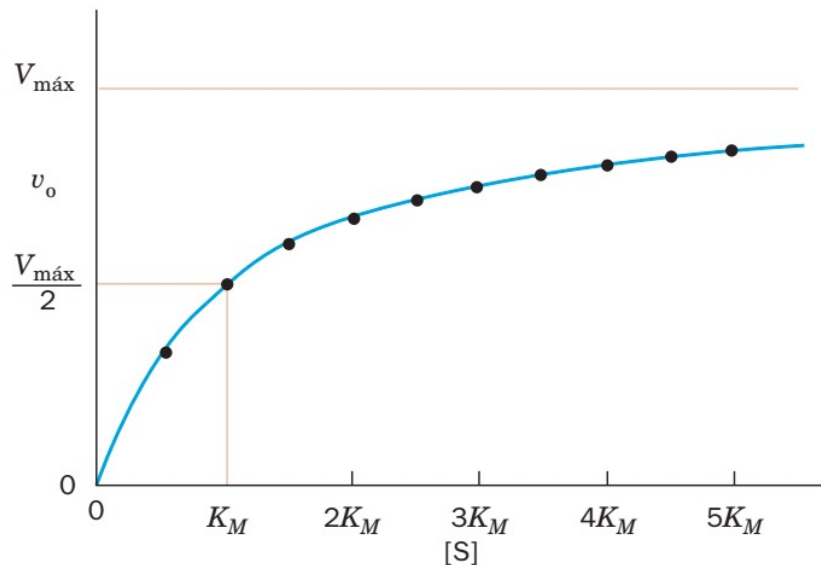
$$v_o = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

**Equação de
Michaelis-Menten**



O significado da constante de Michaelis

$$v_o = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$



Na concentração de substrato em que $[S] = [K_M]$, $V_o = V_{\text{máx}}/2$. Portanto, K_M é a concentração de substrato na qual a velocidade da reação é metade da velocidade máxima.

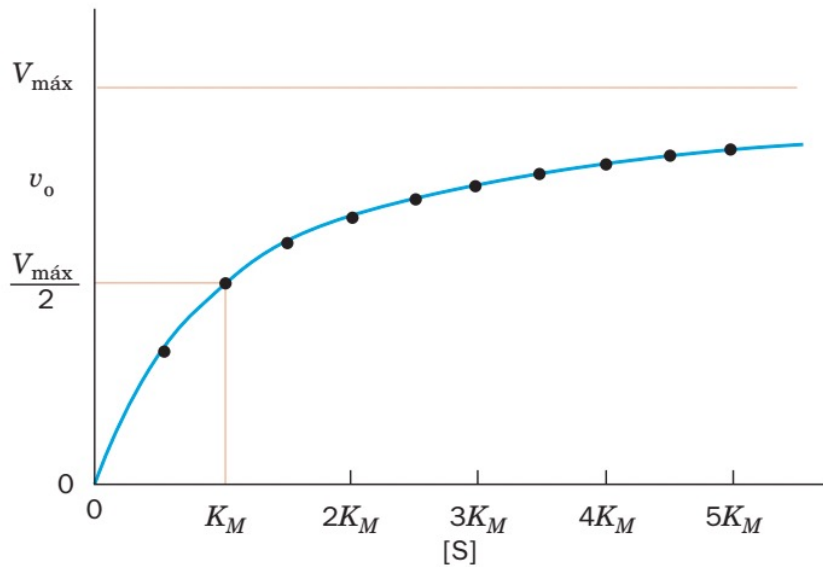
Assim, se uma enzima tiver um valor de K_M pequeno, ela atinge o máximo de eficiência catalítica em baixas concentrações de substrato.

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1}$$

K_M , portanto, também é uma medida da afinidade da enzima pelo seu substrato.

O método de Lineweaver-Burk

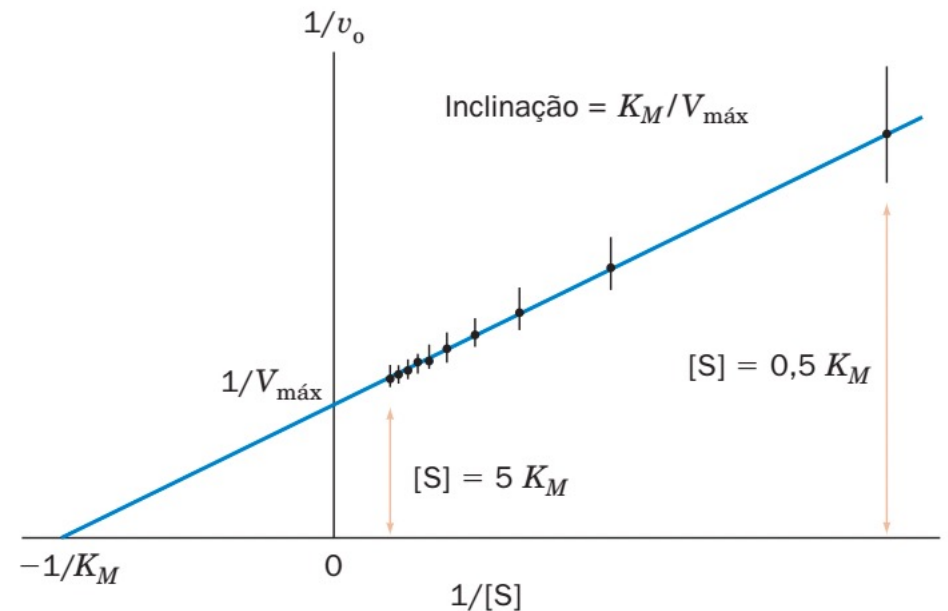
$$v_o = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$



Limitação matemática
para determinar $V_{\text{máx}}$ e K_M

linearização

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}}$$



O parâmetro de eficiência enzimática

Constante catalítica:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{máx}}}{[E]_{\text{T}}}$$

O número de vezes (ciclos de catálise) que cada sítio ativo da enzima catalisa uma reação por unidade de tempo.

Modelo de Michaelis-Menten

$$V_{\text{máx}} = k_2[E]_{\text{T}} \longrightarrow k_{\text{cat}} = k_2$$

Quando: $[S] \ll K_M \longrightarrow [E] \approx [E]_{\text{T}}$

$$v_o = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=t_s} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_{\text{T}}[S]}{K_M + [S]}$$

$$v_o \approx \left(\frac{k_2}{K_M} \right) [E]_{\text{T}} [S] \approx \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} \right) [E] [S]$$

A grandeza k_{cat}/K_M é uma constante de segunda ordem e medida da eficiência catalítica da enzima.

Inibição de enzimas

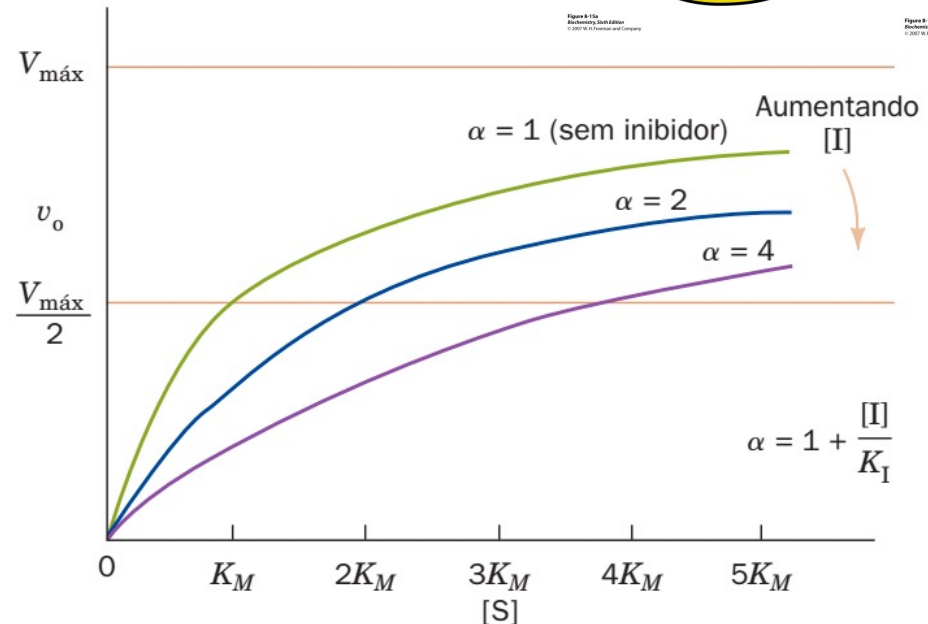
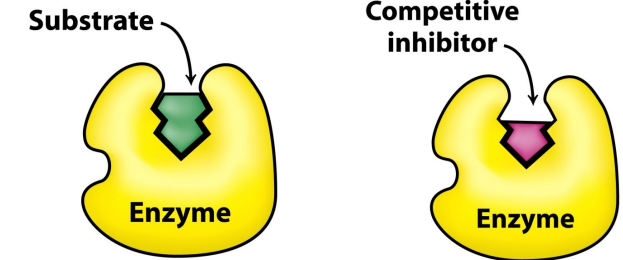
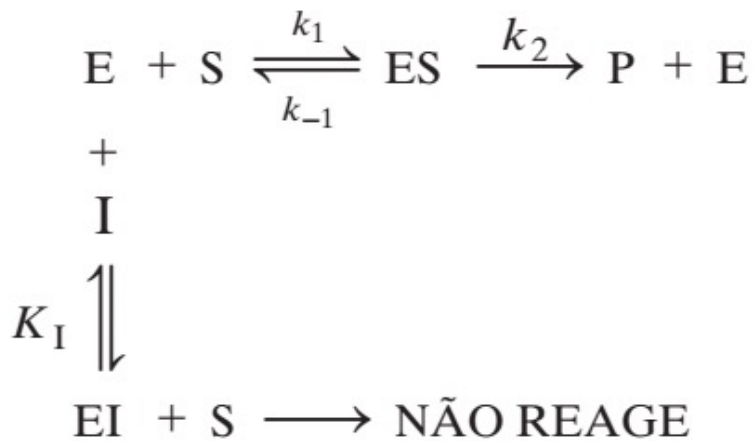
As enzimas podem ter sua atividade reduzida ou bloqueada pela ação de inibidores de distintos tipos. Esta estratégia pode ser útil para estudar os mecanismos enzimáticos e também no desenvolvimento de novos fármacos.

Modos de inibição:

- **Reversível**
Competitivo, incompetitivo e misto.
- **Irreversível**
Covalente e não covalente. Inativadores suicidas com base no mecanismo. Análogos do estado de transição.

Inibição competitiva

Competição direta entre o substrato e o inibidor pelo sitio ativo da enzima.



$$v_o = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

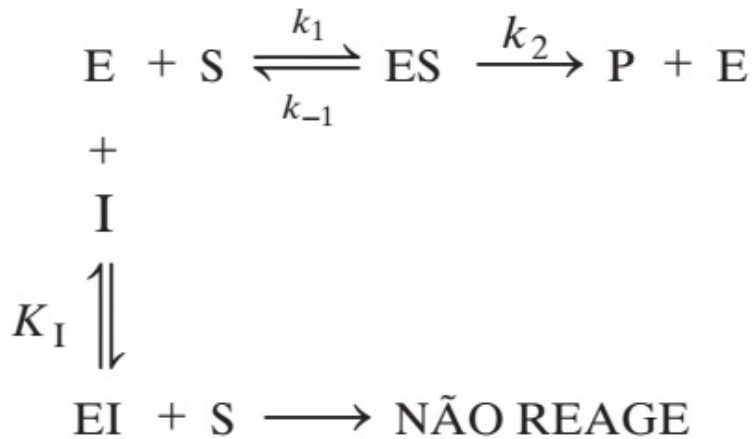
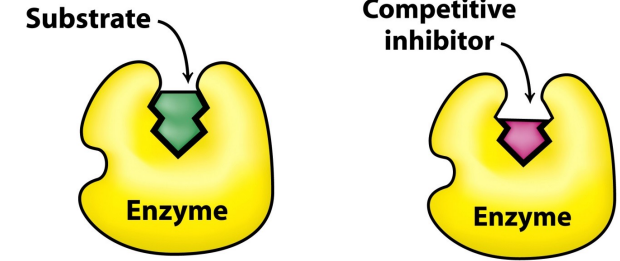
Onde,

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

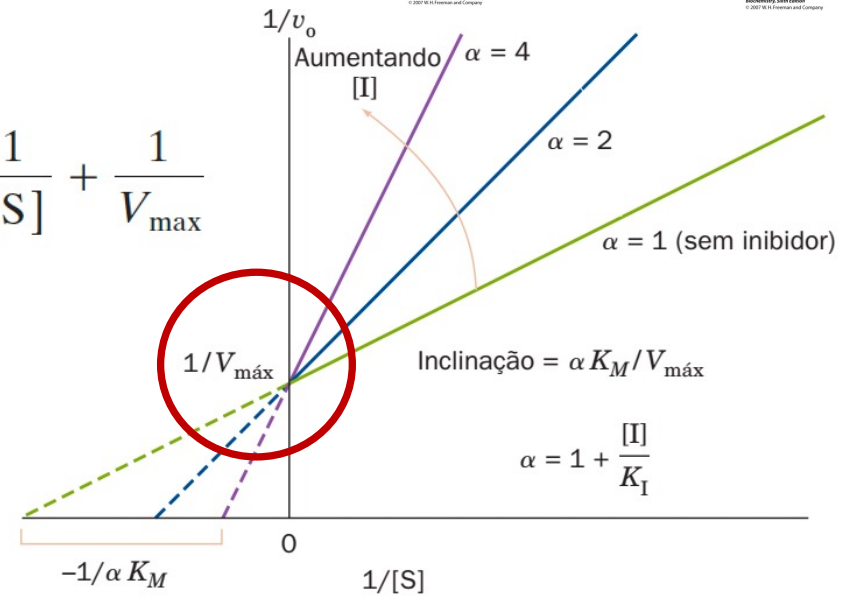
A presença do inibidor tem o efeito de fazer [S] parecer mais diluído do que realmente é, ou, alternativamente, faz K_M parecer maior do realmente é (K_M aparente). $V_{\text{máx}}$ mantida, quando $[S] \gg [I]$.

Inibição competitiva

Competição direta entre o substrato e o inibidor pelo sitio ativo da enzima.



$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$



$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

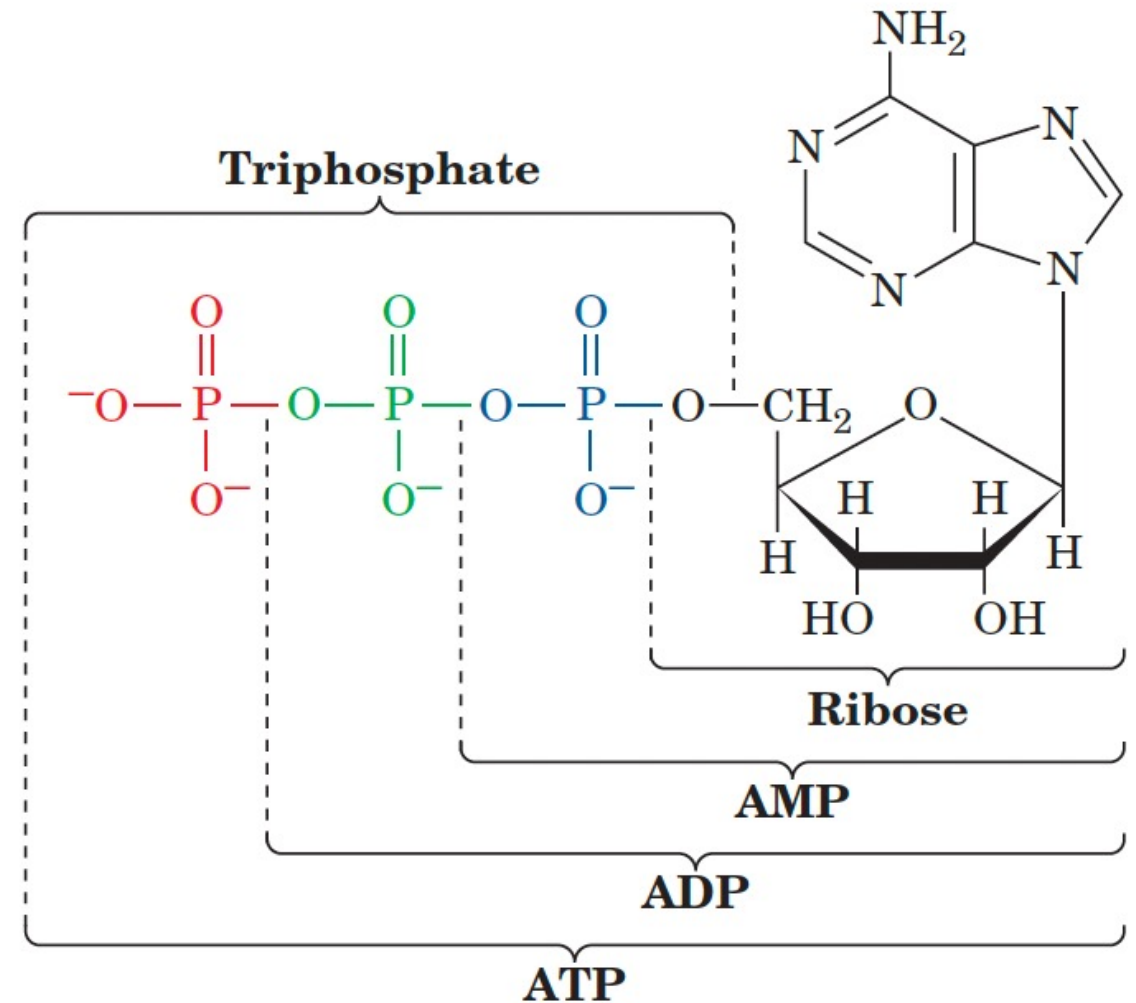
Onde,

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

A presença do inibidor tem o efeito de fazer [S] parecer mais diluído do que realmente é, ou, alternativamente, faz K_M parecer maior do realmente é (K_M aparente). V_{\max} mantida, quando $[S] \gg [I]$.

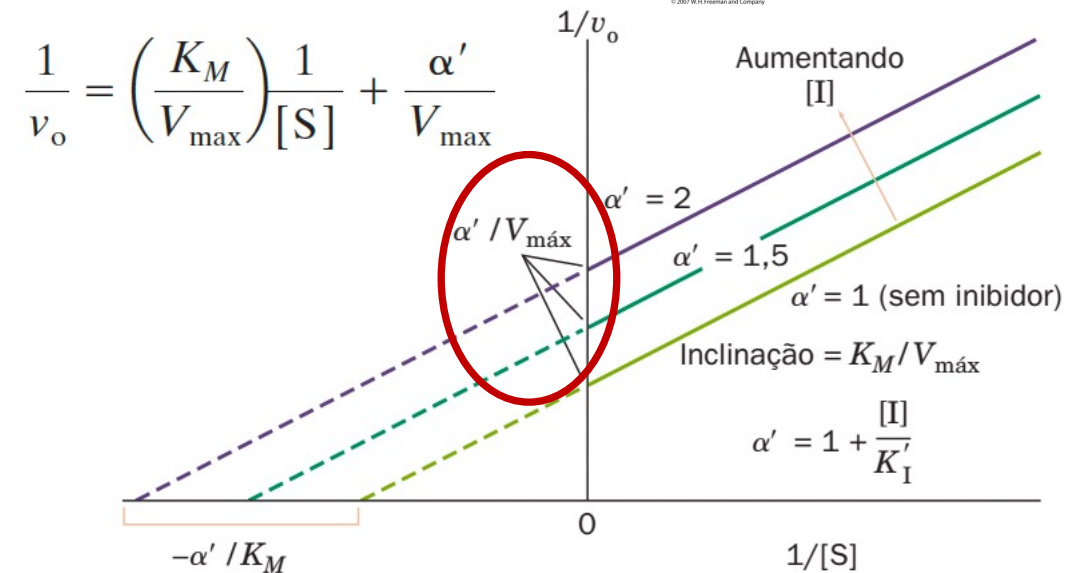
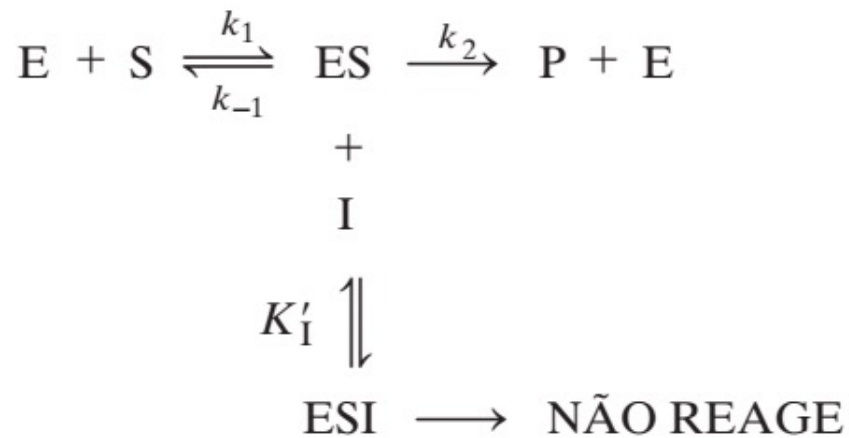
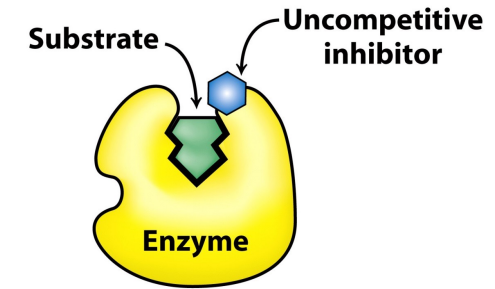
Verificar o efeito de ADP, AMP, Ribose, Trifosfato.

Exemplo: como estudar inibidores competitivos de uma ATPase



Inibição incompetitiva

O inibidor causa distorções na estrutura da enzima causando sua inativação.



$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]}$$

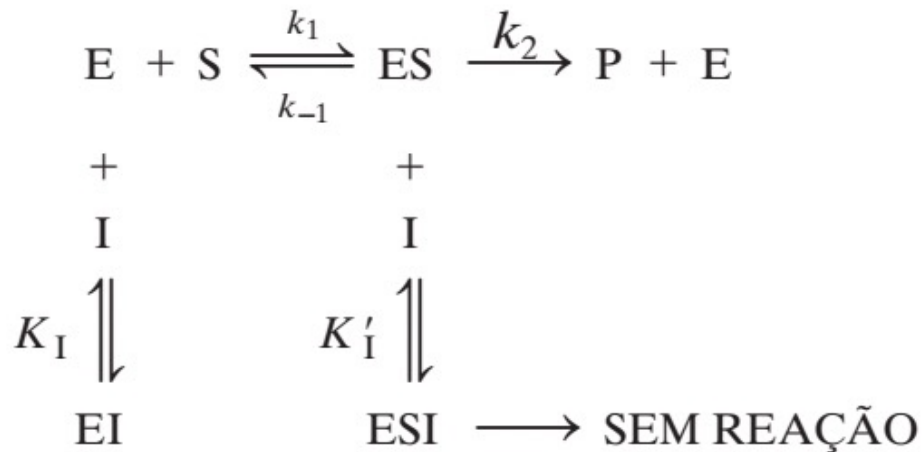
Onde,

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$$

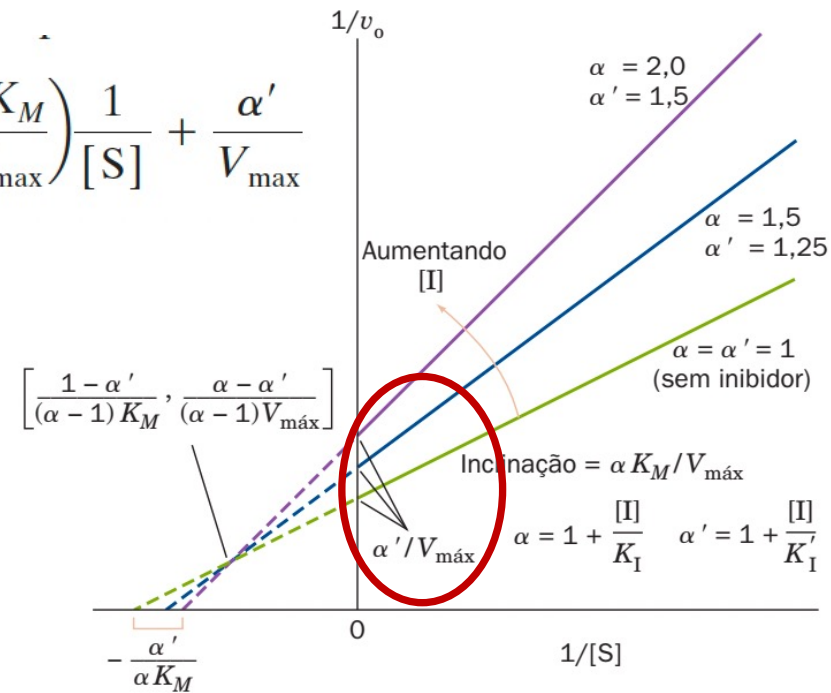
Ao contrário da inibição competitiva, o aumento da concentração do substrato não reverte os efeitos da inibição incompetitiva sobre a V_{\max} .

Inibição mista

O inibidor causa distorções na estrutura da enzima causando sua inativação.



$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$



$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]}$$

Os inibidores mistos são efetivos tanto em baixas como em altas concentrações de substrato.

Resumo do efeito de inibidores sobre parâmetros cinéticos

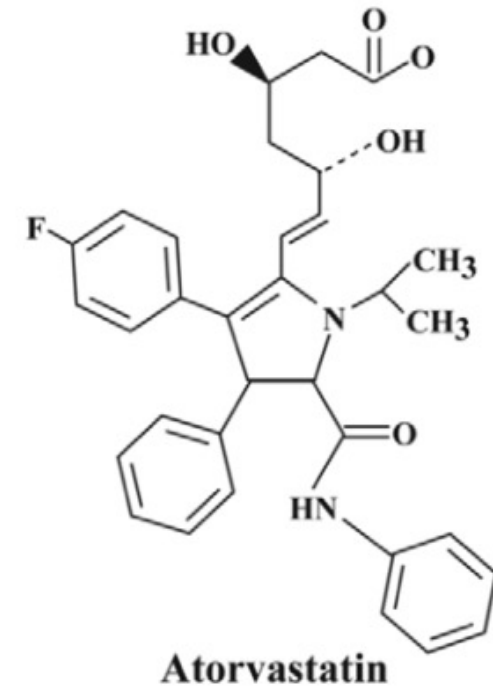
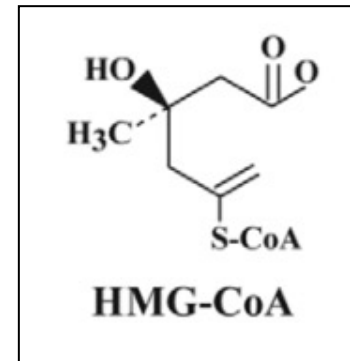
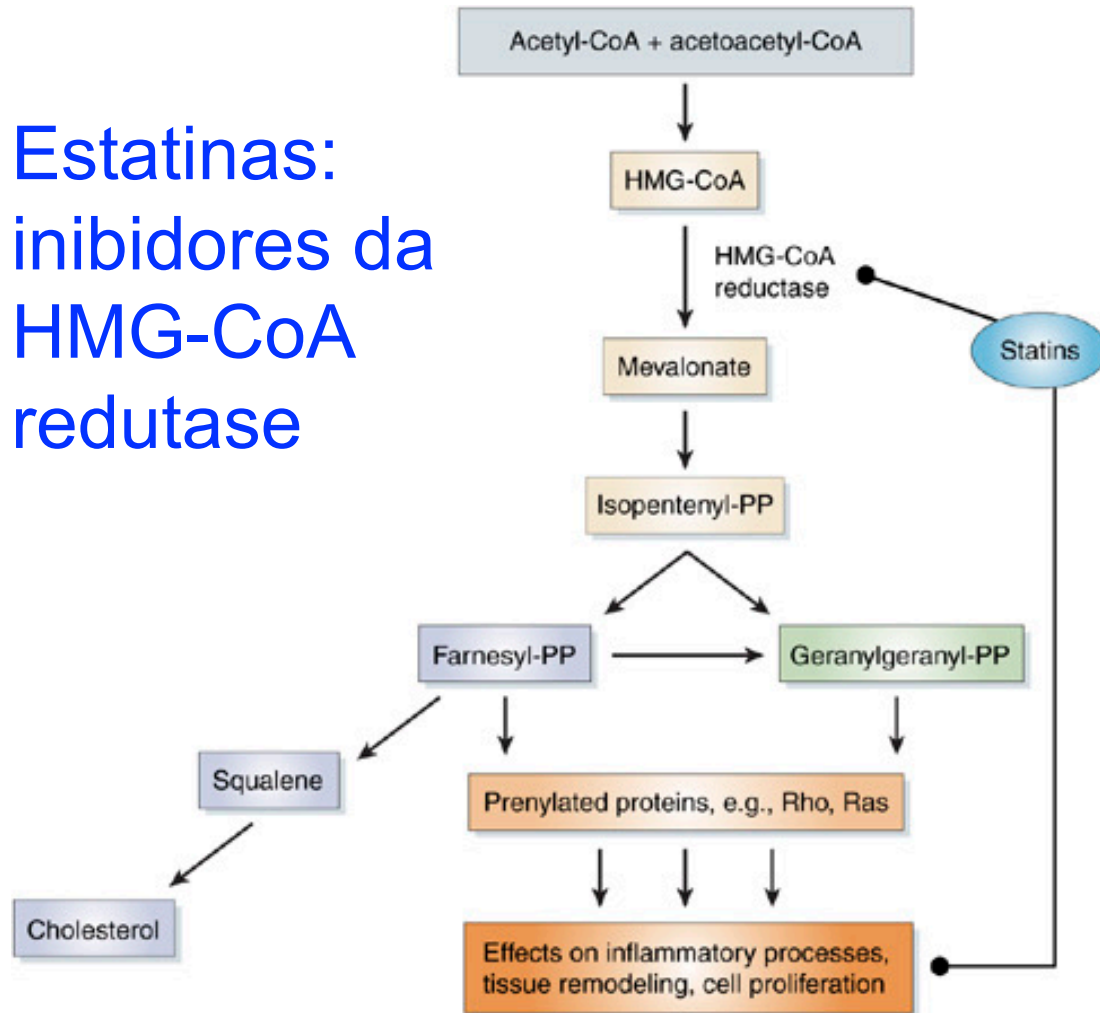
Table 14-2 Effects of Inhibitors on the Parameters of the Michaelis–Menten Equation^a

Type of Inhibition	V_{\max}^{app}	K_M^{app}
None	V_{\max}	K_M
Competitive	V_{\max}	αK_M
Uncompetitive	V_{\max}/α'	K_M/α'
Mixed	V_{\max}/α'	$\alpha K_M/\alpha'$

$$^a\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \text{ and } \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I'}$$

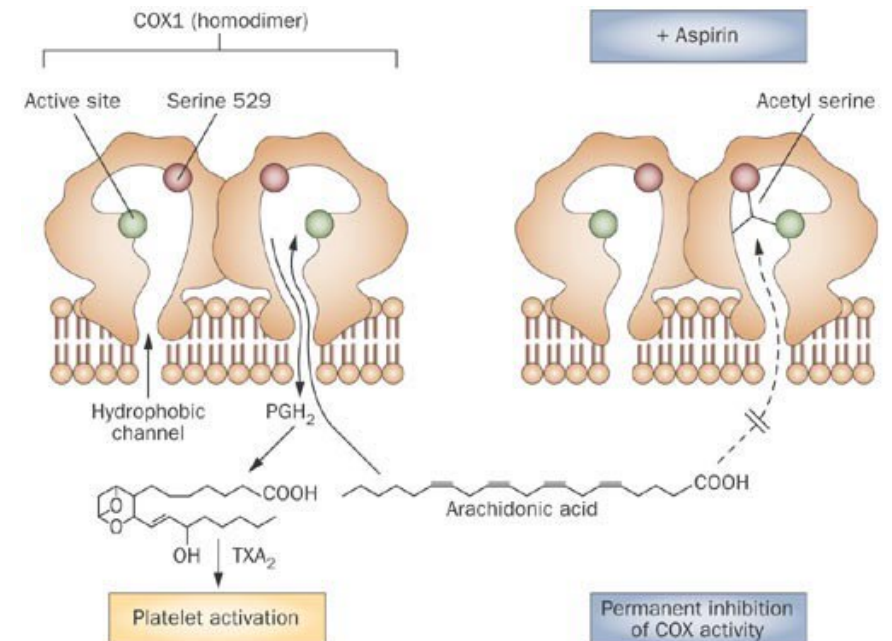
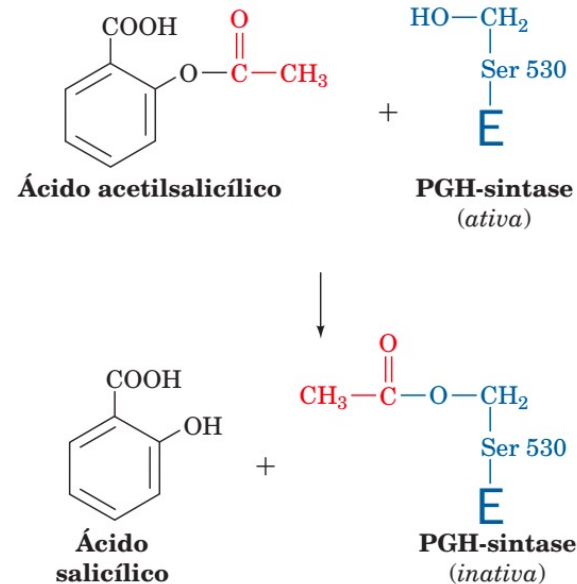
Uso de inibidores enzimáticos como medicamentos

- Estatinas: inibidores da HMG-CoA redutase



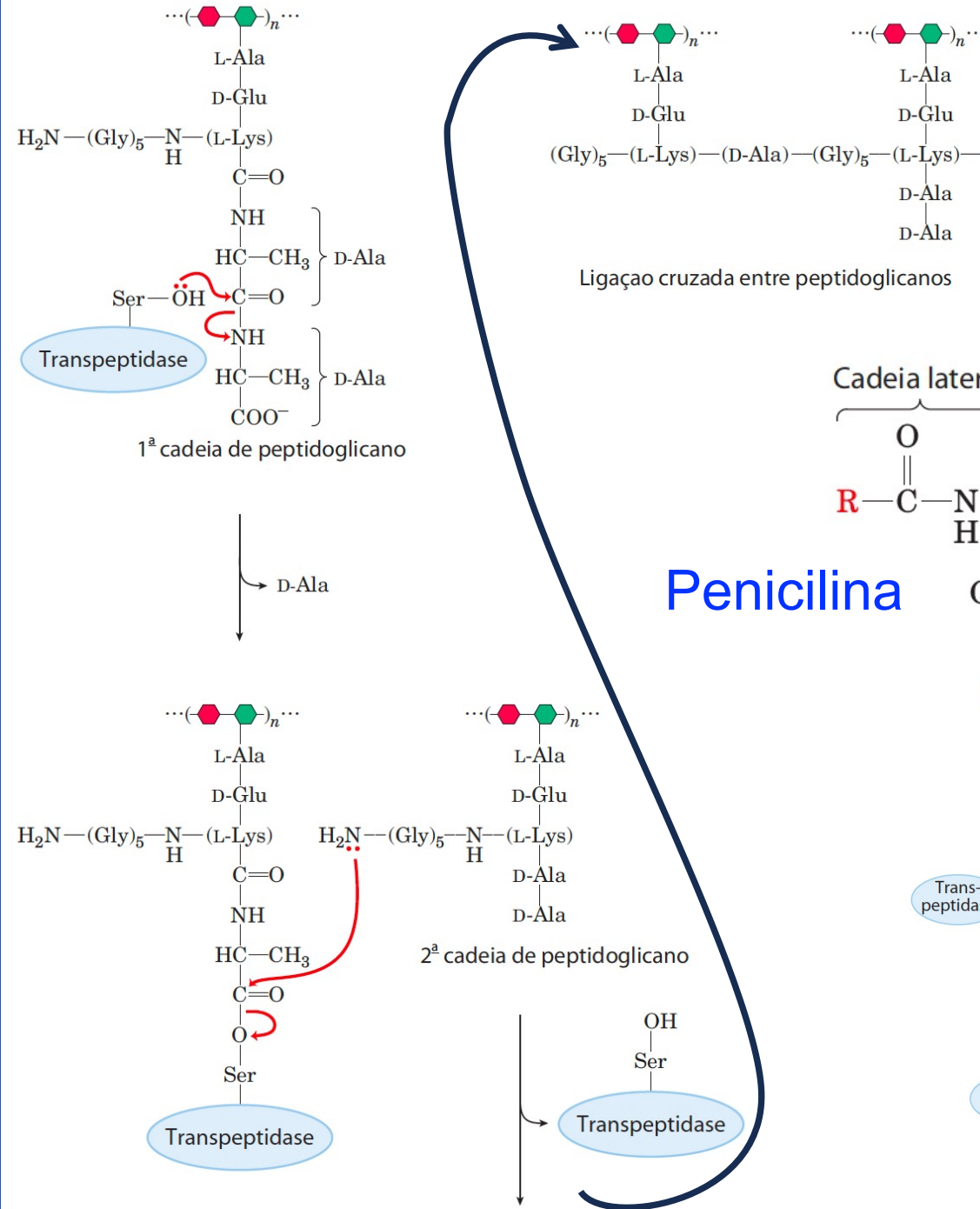
Uso de inibidores enzimáticos como medicamentos

➤ Aspirina:
inibidor da
ciclooxigenase 1

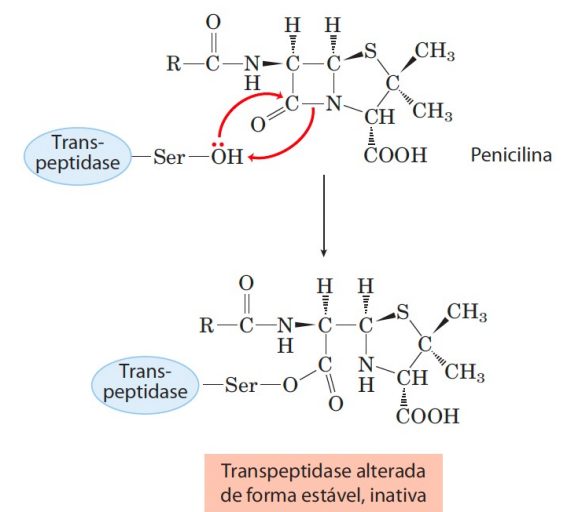
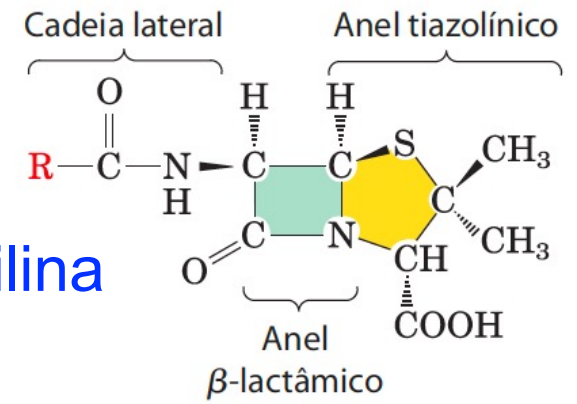


Uso de inibidores enzimáticos como medicamentos

Penicilina: inibidor da síntese da parede bacteriana



Penicilina



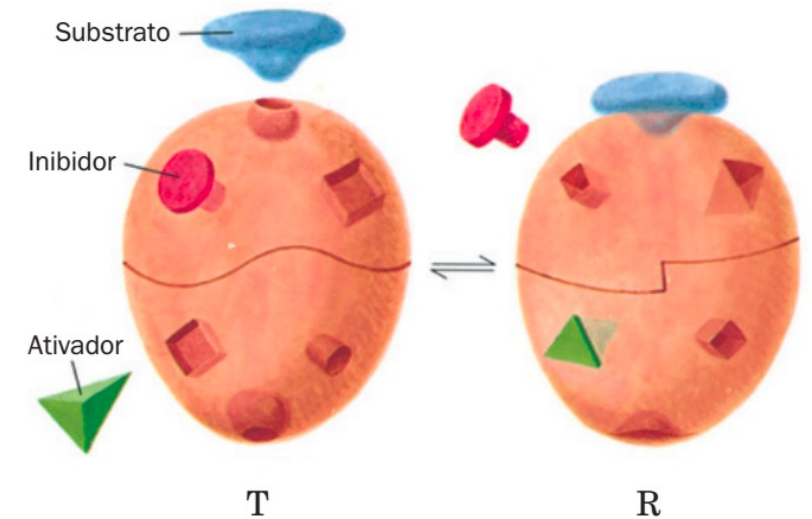
(b)

Enzimas regulatórias

As enzimas funcionam encadeadas em vias metabólicas altamente interconectadas. Algumas enzimas exercem papel regulador do fluxo metabólico por catalisarem reações que não estão em equilíbrio. Este papel regulador ocorre pela modulação da atividade catalítica da enzima em questão, seja pela **ligação de moléculas efetoras**, seja pela **modificação covalente reversível** associada a cascatas de sinalização celular.

Regulação da atividade enzimática

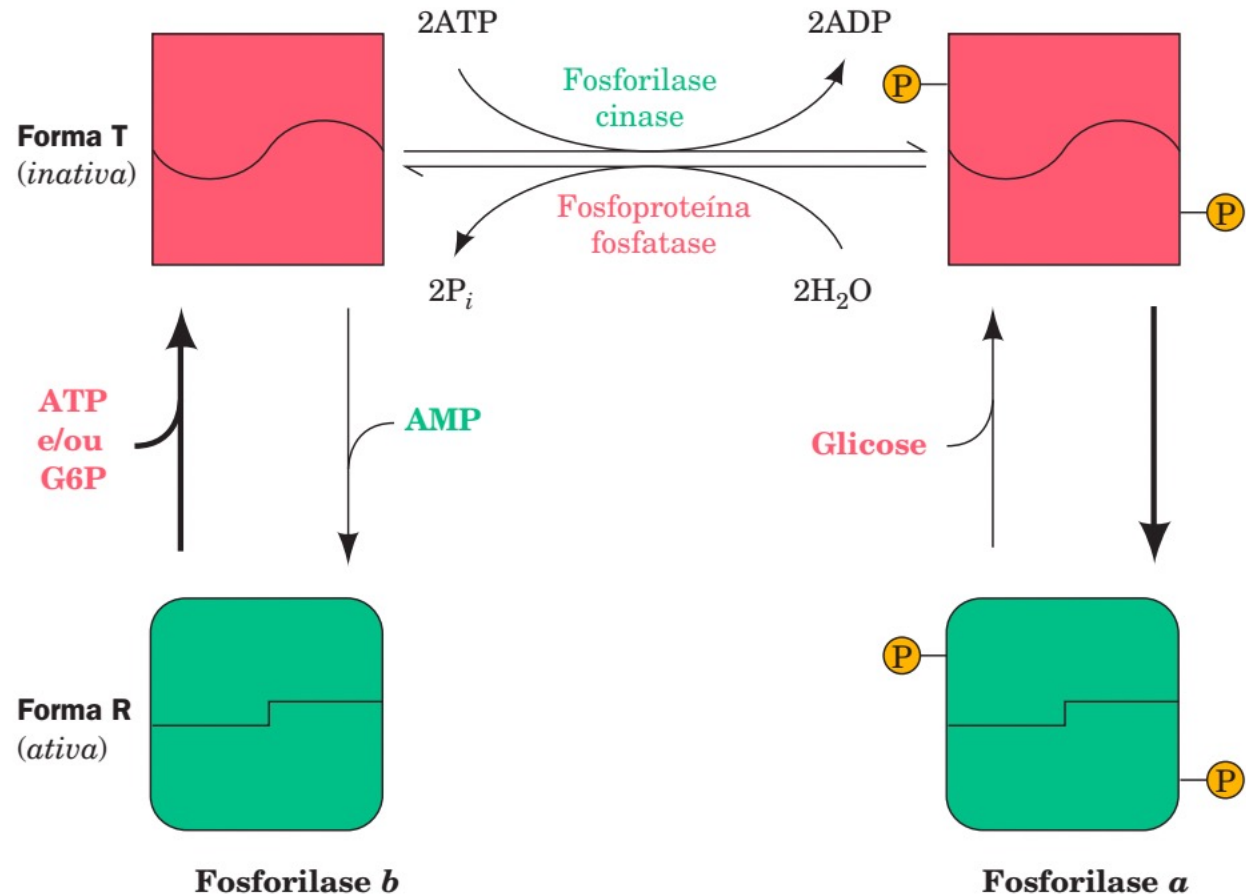
Mecanismo alostérico: ligações reversíveis e não covalentes de moléculas moduladoras que geralmente são metabolitos relacionados direta ou indiretamente a via em que participa a enzima. Geram mudanças conformacionais, que podem interconverter a enzima entre um estado ativo e outro inativo.



Modificação pós-traducional: através da conjugação de grupos químicos aos seus resíduos de aminoácidos, uma enzima pode ser ativada ou inativada.

Metabolismo do glicogênio

A glicogênio fosforilase catalisa a etapa que regula a degradação de glicogênio e esta sujeita tanto a controle alostérico quanto a modificação covalente por fosforilação.



Exercícios

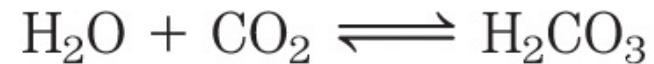
1) A tabela seguinte indica a velocidade de uma reação na qual o substrato é catalisado por uma enzima que segue o mecanismo de Michaelis-Menten: (1) na ausência de inibidor; (2) e (3) na presença de uma concentração 10 mM de dois inibidores diferentes. Considere que $[E]_T$ seja a mesma para todas as reações.

[S] (mM)	(1) v_o ($\mu M \cdot s^{-1}$)	(2) v_o ($\mu M \cdot s^{-1}$)	(3) v_o ($\mu M \cdot s^{-1}$)
1	2,5	1,17	0,77
2	4,0	2,10	1,25
5	6,3	4,00	2,00
10	7,6	5,7	2,50
20	9,0	7,2	2,86

(a) Determine os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima. Determine, para cada um dos inibidores, o tipo de inibição e K_i e/ou K_i' . Que informações a mais seriam necessárias para poder calcular o número de renovação enzimática? (b) Para $[S] = 5$ mM, qual a proporção de moléculas de enzima que está ligada ao substrato na ausência de inibidor; na presença de 10 mM de inibidor do tipo (2); e na presença de 10 mM de inibidor do tipo (3)?

Exercícios

2) A anidrase carbônica dos eritrócitos (Mr 30.000) tem um dos números de renovação mais altos conhecidos. Ela catalisa a hidratação reversível do CO₂:



Este é um processo importante no transporte de CO₂ dos tecidos para os pulmões. Se 10,0 µg de anidrase carbônica pura catalisam a hidratação de 0,30 g de CO₂ em 1 min a 37°C em V_{máx}, qual é o número de renovação (kcat) da anidrase carbônica (em unidades de min⁻¹)?

3) A cachaça feita em fábricas clandestinas pode levar a cegueira. Isto ocorre, pois a cachaça clandestina possui metanol, que, por ação da álcool desidrogenase, é convertido a formaldeído, substância extremamente tóxica (especialmente para os olhos). **A intoxicação por metanol é tratada por infusão intravenosa de etanol.** Como se justifica esta terapia? Que tipo de inibição você atribui ao etanol? Explique.

Bibliografia

- **Donald Voet e Judith G. Voet, Biochemistry, 4th edition.**
- **David L. Nelson e Michael M. Cox, Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6^a edição.**